

24. 9. 2004

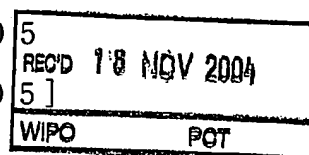
日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 9月 4日

出願番号
Application Number: 特願2003-313305
[ST. 10/C]: [JP 2003-313305]



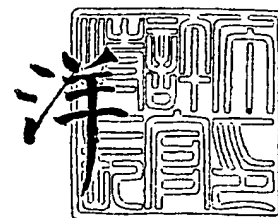
出願人
Applicant(s): 江崎グリコ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 PH15-053
【提出日】 平成15年 9月 4日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 9/10
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府吹田市朝日町 13-8-406
 【氏名】 藤井 和俊
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府向日市森本町野田 14-2-709
 【氏名】 飯干 雅恵
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区桜口町 5丁目 1番 1-603
 【氏名】 柳瀬 美千代
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区楠丘町 6丁目 5-20-304
 【氏名】 高田 洋樹
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県神戸市北区日の峰 4-7-16
 【氏名】 鷹羽 武史
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府吹田市五月が丘東 8番 C-512
 【氏名】 栗木 隆
【特許出願人】
 【識別番号】 000000228
 【氏名又は名称】 江崎グリコ株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100078282
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 山本 秀策
【選任した代理人】
 【識別番号】 100062409
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 安村 高明
【選任した代理人】
 【識別番号】 100113413
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 森下 夏樹
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 001878
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0207269

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

天然のスクロースホスホリラーゼを改変して得られる耐熱化スクロースホスホリラーゼであって、

該耐熱化スクロースホスホリラーゼは、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置、62位セリン(S62)に相当する位置、77位チロシン(Y77)に相当する位置、128位バリン(V128)に相当する位置、140位リジン(K140)に相当する位置、144位グルタミン(Q144)に相当する位置、155位アスパラギン(N155)に相当する位置および249位アスパラギン酸(D249)に相当する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置において、該天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有し、かつ

該耐熱化スクロースホスホリラーゼを20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で55℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上である、

耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項2】

前記天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも40%の同一性を有する、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項3】

前記天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有する、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項4】

前記天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされる、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項5】

前記天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択される、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項6】

前記天然のスクロースホスホリラーゼが、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Oenococcus oeni*、*Bifidobacterium longum*、*Agrobacterium vitis*、*Pseudomonas saccharophila*、*Escherichia coli*および*Listeria innocua*からなる群より選択される細菌由来である、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項7】

前記天然のスクロースホスホリラーゼが、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*、*Leuconostoc mesenteroides*および*Oenococcus oeni*からなる群より選択される細菌由来である、請求項1に記載の耐

熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項8】

前記天然のスクロースホスホリラーゼが、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*または*Streptococcus sorbinus*に由来する、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項9】

前記T47に相当する位置におけるアミノ酸残基が、セリンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項10】

前記S62に相当する位置におけるアミノ酸残基が、プロリンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項11】

前記Y77に相当する位置におけるアミノ酸残基が、ヒスチジンまたはトリプトファンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項12】

前記Y77に相当する位置におけるアミノ酸残基が、ヒスチジンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項13】

前記V128に相当する位置におけるアミノ酸残基が、ロイシンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項14】

前記K140に相当する位置におけるアミノ酸残基が、メチオニンまたはシステインである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項15】

前記K140に相当する位置におけるアミノ酸残基が、メチオニンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項16】

前記Q144に相当する位置におけるアミノ酸残基がアルギニンまたはリジンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項17】

前記Q144に相当する位置におけるアミノ酸残基が、アルギニンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項18】

前記N155に相当する位置におけるアミノ酸残基がセリンまたはトレオニンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項19】

前記N155に相当する位置におけるアミノ酸残基がセリンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項20】

前記D249に相当する位置におけるアミノ酸残基がグリシンまたはアラニンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項21】

前記D249に相当する位置におけるアミノ酸残基がグリシンである、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項22】

前記耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で57℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の10%以上である、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項23】

前記耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で57℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上である、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項24】

前記耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20%スクロースを含む20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で65℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の10%以上である、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項25】

前記耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20%スクロースを含む20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で65℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上である、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項26】

少なくとも前記T47に相当する位置において、前記天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有する、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項27】

少なくとも前記D249に相当する位置において、前記天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有する、請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ。

【請求項28】

耐熱化スクロースホスホリラーゼを調製する方法であって、

第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む第一の核酸分子を改変して、改変塩基配列を含む第二の核酸分子を得る工程；

該第二の核酸分子を含む発現ベクターを作製する工程；

該発現ベクターを細胞に導入して耐熱化スクロースホスホリラーゼを発現させる工程；
および

該発現された耐熱化スクロースホスホリラーゼを回収する工程
を包含し、

該耐熱化スクロースホスホリラーゼは、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置、62位セリン(S62)に相当する位置、77位チロシン(Y77)に相当する位置、128位バリン(V128)に相当する位置、140位リジン(K140)に相当する位置、144位グルタミン(Q144)に相当する位置、155位アスパラギン(N155)に相当する位置および249位アスパラギン酸(D249)に相当する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置において、該第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を有し、かつ

該耐熱化スクロースホスホリラーゼを20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で55℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上である、

方法。

【請求項29】

前記第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも40%の同一性を有する、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも60%

の同一性を有する、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

前記第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされる、請求項28に記載の方法。

【請求項32】

前記第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択される、請求項28に記載の方法。

【請求項33】

前記第一のスクロースホスホリラーゼが、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Oenococcus oeni*、*Bifidobacterium longum*、*Agrobacterium vitis*、*Pseudomonas saccharophila*、*Escherichia coli*および*Listeria innocua*からなる群より選択される細菌由来である、請求項28に記載の方法。

【請求項34】

前記第一のスクロースホスホリラーゼが、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*、*Leuconostoc mesenteroides*および*Oenococcus oeni*からなる群より選択される細菌由来である、請求項28に記載の方法。

【請求項35】

前記第一のスクロースホスホリラーゼが、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*または*Streptococcus sorbinus*に由来する、請求項28に記載の方法。

【請求項36】

前記耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で57℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の10%以上である、請求項28に記載の方法。

【請求項37】

前記耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で57℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上である、請求項28に記載の方法。

【請求項38】

前記耐熱化スクロースホスホリラーゼが、少なくとも前記T47に相当する位置において、前記第一のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有する、請求項28に記載の方法。

【請求項39】

前記耐熱化スクロースホスホリラーゼが、少なくとも前記D249に相当する位置において、前記第一のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有する、請求項28に記載の方法。

【請求項40】

請求項1に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む、核酸分子。

【請求項 4 1】

請求項 4 0 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 4 2】

請求項 4 0 に記載の核酸分子を含む、細胞。

【請求項 4 3】

グルコース-1-リン酸の合成方法であって、該方法は、請求項 1 に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼ、スクロースおよび無機リン酸を含む反応溶液を反応させて、グルコース-1-リン酸を生産する工程を包含する、方法。

【請求項 4 4】

前記反応が、50℃～70℃の温度で行われる、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

グルコース重合体の合成方法であって、該方法は、請求項 1 に記載の耐熱化スクロースホスホリラーゼと、 α -グルコース-1-リン酸を基質とする第二のホスホリラーゼと、スクロースと、プライマーと、無機リン酸またはグルコース-1-リン酸とを含む反応液を反応させて、グルコース重合体を生産する工程を包含する、方法。

【請求項 4 6】

前記グルコース重合体が α -グルカンである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記第二のホスホリラーゼが、 α -グルカンホスホリラーゼである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記第二のホスホリラーゼが、セロビオースホスホリラーゼ、セロデキストリンホスホリラーゼ、ラミナリビオースホスホリラーゼ、ラミナリデキストリンホスホリラーゼ、 β -1, 3-グルカンホスホリラーゼおよびトレハロースホスホリラーゼからなる群より選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記反応が、50℃～70℃の温度で行なわれる、請求項 4 5 に記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】スクロースホスホリラーゼ (SP) の耐熱化方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、耐熱性スクロースホスホリラーゼおよびこの耐熱性スクロースホスホリラーゼをコードする遺伝子に関する。さらに本発明は、耐熱性スクロースホスホリラーゼの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

スクロースホスホリラーゼ (以下、SP、SP酵素ともいう) は、例えば、 α -グルカン合成、G-1-P合成などに利用されている酵素である。

【0003】

α -グルカン (特に不溶性のアミロース) には、食物繊維と同様の働きが予想され、健康食品への利用も期待できる。さらに、直鎖状 α -グルカンであるアミロースは、例えばヨウ素、脂肪酸などを分子内に包接し得る特徴を持つことから、医薬品、化粧品、サニタリー製品分野での用途が期待される。アミロースはまた、アミロースと同様の包接能力を持つシクロデキストリンおよびシクロアミロースの製造用原料に利用できる。さらに、アミロースを含有したフィルムは、汎用プラスチックに劣らない引張強度を持ち、生分解性プラスチックの素材として非常に有望である。このようにアミロースには、多くの用途が期待されている。しかし、実質的に純粋なアミロースは得ることが困難であり、非常に高価であるので、試薬レベルで流通しているだけであり、産業用素材としてはほとんど利用されていない。そのため、安定的かつ安価にアミロースを製造する方法が望まれている。

【0004】

G-1-Pは例えば、医療用抗菌剤、抗腫瘍剤 (白金錯体)、心臓病の治療薬 (アミン塩)、 α -グルカン合成の基質として利用されている。

【0005】

SPは、いくつかの細菌 (*Streptococcus* 属の細菌、*Leuconostoc* 属の細菌、大腸菌、乳酸菌など) に存在することが報告されており、これらの細菌の有するSPのアミノ酸配列および塩基配列は公知である。

【0006】

α -グルカンまたはG-1-Pの製造には、種々のSPが用いられ得、*Leuconostoc* 属の細菌由来のSPが用いられることが多い。なぜなら、比較的大量の酵素が得やすいからである。

【0007】

α -グルカンの工業的な生産においては、夾雑する他の酵素活性、特にホスファターゼ活性およびアミラーゼ活性をできるだけ除去する必要がある。SPおよびGPを用いて α -グルカンを合成する場合、ホスファターゼが存在すると、反応中間体として合成されるG-1-Pが分解され、 α -グルカンの収率が低下するからである。アミラーゼが存在すると、合成された α -グルカンが分解され、分子量の低下を引き起こすからである。このためにこれらの夾雑酵素を除去する必要がある。SPを大量に製造するために、SP遺伝子を発現させる宿主としては、大腸菌および枯草菌が望ましい。ところが、図2および図3に示したように、大腸菌はアミラーゼ活性およびホスファターゼ活性を、枯草菌はアミラーゼ活性をそれぞれ菌体内に有している。しかしながら、図2および図3に示したように、これら宿主の有する酵素は、55℃の熱処理で失活させることはできないが、熱処理温度を60℃にすると、ほぼ失活させることができる。したがって、60℃の熱処理でもそれほど活性を失わない耐熱性を有するSP、あるいは、アミラーゼまたはホスファターゼよりも耐熱性が高いSPが望まれていた。

【0008】

参考として、種々の細菌 (大腸菌TG-1株、大腸菌BL21株、および枯草菌ANAN-1株) の菌体抽出液中の加熱前および加熱後のアミラーゼ活性およびホスファターゼ活

性の具体的な数値を以下の表1に示す。

【0009】

【表1】

	ホスファターゼ		アミラーゼ		
	活性 (%)		活性 (%)		
	TG-1	BL21	TG-1	BL21	ANA-1
加熱前	100	100	100	100	100
50℃	99.1	98.6	21.6	28.6	33.8
55℃	60.9	74.5	9.1	9.7	19.8
60℃	2.9	3.1	0.4	0	3.0
65℃	2.5	2.0	0.9	0	2.4

しかし、SPで耐熱性を有するもの、特に高温（例えば、60℃～75℃）で十分な活性を維持できるSPは知られていない。

【0010】

α -グルカンまたはG-1-Pの製造においてはまた、反応をできるだけ高温で行うことが好ましい。なぜなら、一般的に酵素反応を高温で行うほど、反応速度が上昇し、 α -グルカンの操作性が上昇するためである。 α -グルカン、特にアミロースは老化して不溶化し、沈澱またはゲルを形成する。この老化速度は、温度に依存することが周知である。反応温度が低い場合には、製造後のアミロース溶液がゲル化するなど、その後の段階で操作性に問題が生じる。反応を高温で行うためには、酵素が耐熱性であることが必要である。

【0011】

しかし、上記の細菌は、いずれも中温菌であり、細菌由来のSPで耐熱性を有するSP、特に高温（例えば、50℃～60℃）で十分な活性を維持できるSPは知られていない。そのため、従来のSPの場合には、加熱処理によって精製コストを低下させることはできず、高温で反応を行うこともできない。

【0012】

細菌（原核生物）以外に由来するSPについては、カビ（真核生物）由来のSPが報告されている（非特許文献1を参照）。この文献によれば、*Monilia sitophila* (*Neurospora intermedia*としても公知) 由来のSPは、70℃で30分間加熱した後に、90%以上の活性が残存する。

【0013】

しかし、この文献で報告された実験結果は、非常に精製度の低いSPを用いての実験結果であり、観察しているSP活性も本当にSP活性を定量的に測定できているか疑問が残る。さらに、カビの多くは菌体外にアミラーゼを分泌するので、SP酵素を利用するためには高度の精製が必要となり、SP酵素を精製するために時間およびコストが非常にかかる。精製を容易にするために、ホスファターゼおよびアミラーゼの分泌量が少ない宿主に遺伝子組換え技術を用いてこのカビ由来のSP酵素を導入することは不可能である。なぜなら、このカビ由来のSPについては、アミノ酸配列も塩基配列も公知ではないからである。

【0014】

SP酵素については、酵素を固定化することによって耐熱性が向上したとの報告はある

が、固定化酵素は基質特異性が変化することがあるなどの欠点を有し、かつ固定化による耐熱性向上には限界があるので、SP酵素自体の耐熱性を向上させることが望ましい。SP酵素に変異を導入することによって耐熱化することについての報告はない。

【0015】

SP酵素は、高濃度スクロースの存在下では見かけの耐熱性が向上する（特許文献1を参照のこと）。しかし、高濃度スクロースの存在による耐熱性の上昇は限界があるので、SP酵素自体の耐熱性が上昇することが望まれている。

【0016】

これらの問題を解決するために、工業的利用に有利な、耐熱性が高いSPが必要とされている。

【0017】

一方、一般的な酵素の耐熱化については、プロリンセオリー、酵素の立体構造情報に基づくアミノ酸置換などの理論的方法が試みられているが、必ずしも成功していない。そのため、現在でも依然として、ランダム変異による方法またはランダム変異と理論的方法との組み合わせによる方法が主に行われている。いずれの方法でも、それぞれのタンパク質ごとに試行錯誤的に試す必要がある。

【0018】

SP以外の酵素に関しては、耐熱化にかかわる特定のアミノ酸の位置を決定できれば、特定した1箇所または複数箇所の位置のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換することによって、酵素を耐熱化できることが報告されている（例えば、非特許文献2～4を参照のこと）。

【特許文献1】国際公開第02/097077号パンフレット

【非特許文献1】M. C. B. Pimentelら、「SCREENING, THERMAL PROPERTIES AND PRODUCTION IN YAM EXTRAT OF FUNGAL SUCROSE PHOSPHORYLAS E」、Rev. Microbiol., Sao Paulo, 1992、23 (3)、pp. 199-205

【非特許文献2】Martin LehmannおよびMarkus Wyss著、「Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution」、Current Opinion in Biotechnology、2001、12、pp. 371-375

【非特許文献3】M. Lehmannら著、「The consensus concept for thermostability engineering of proteins」、Biochimica Biophysica Acta、2000、1543、pp. 408-415

【非特許文献4】Junichi Miyazakiら著、「Ancestral Residues Stabilizing 3-Isopropylmalate Dehydrogenase of an Extreme Thermophile: Experimental Evidence Supporting the Thermophilic Common Ancestor Hypothesis」、J. Biochem、2001、129、pp. 777-782

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明は、上記問題点の解決を意図するものであり、従来のスクロースホスホリラーゼよりも耐熱性が高いスクロースホスホリラーゼを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明者らは、遺伝子配列が公知のSP酵素を耐熱化することによって上記の課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、SPの配列中の特定の位置のアミノ酸残基を置換することによって、耐熱性が向上したSPが得られることを最終的に見出し、これに基づいて本発明を完成させた。

【0021】

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、天然のスクロースホスホリラーゼを改変して得られる耐熱化スクロースホスホリラーゼであって、該耐熱化スクロースホスホリラーゼは、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置、62位セリン(S62)に相当する位置、77位チロシン(Y77)に相当する位置、128位バリン(V128)に相当する位置、140位リジン(K140)に相当する位置、144位グルタミン(Q144)に相当する位置、155位アスパラギン(N155)に相当する位置および249位アスパラギン酸(D249)に相当する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置において、該天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有し、かつ該耐熱化スクロースホスホリラーゼを20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で55℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上である。

【0022】

1つの実施形態では、上記天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも40%の同一性を有し得る。

【0023】

1つの実施形態では、上記天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有し得る。

【0024】

1つの実施形態では、上記天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされ得る。

【0025】

1つの実施形態では、上記塩基配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17および配列番号19からなる群より選択され得る。

【0026】

1つの実施形態では、上記天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択され得る。

【0027】

1つの実施形態では、上記天然のスクロースホスホリラーゼは、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Oenococcus oeni*、*Bifidobacterium longum*、*Agrobacterium vitis*、*Pseudomonas saccharophila*、*Escherichia coli*および*Listeria innocua*からなる群より選択される細菌由来であり得、より好ましくは*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、S

treptococcus sorbinus、*Leuconostoc mesenteroides*および*Oenococcus oeni*からなる群より選択される細菌由来であり得、そしてさらに好ましくは*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*または*Streptococcus sorbinus*に由来し得る。

【0028】

1つの実施形態では、上記T47に相当する位置におけるアミノ酸残基は、セリンであり得る。

【0029】

1つの実施形態では、上記S62に相当する位置におけるアミノ酸残基は、プロリンであり得る。

【0030】

1つの実施形態では、上記Y77に相当する位置におけるアミノ酸残基は、ヒスチジンまたはトリプトファンであり得る。

【0031】

1つの実施形態では、上記Y77に相当する位置におけるアミノ酸残基は、ヒスチジンであり得る。

【0032】

1つの実施形態では、上記V128に相当する位置におけるアミノ酸残基は、ロイシンであり得る。

【0033】

1つの実施形態では、上記K140に相当する位置におけるアミノ酸残基は、メチオニンまたはシステインであり得る。

【0034】

1つの実施形態では、上記K140に相当する位置におけるアミノ酸残基は、メチオニンであり得る。

【0035】

1つの実施形態では、上記Q144に相当する位置におけるアミノ酸残基は、アルギニンまたはリジンであり得る。

【0036】

1つの実施形態では、上記Q144に相当する位置におけるアミノ酸残基は、アルギニンであり得る。

【0037】

1つの実施形態では、上記N155に相当する位置におけるアミノ酸残基は、セリンまたはトレオニンであり得る。

【0038】

1つの実施形態では、上記N155に相当する位置におけるアミノ酸残基は、セリンであり得る。

【0039】

1つの実施形態では、上記D249に相当する位置におけるアミノ酸残基は、グリシンまたはアラニンであり得る。

【0040】

1つの実施形態では、上記D249に相当する位置におけるアミノ酸残基は、グリシンであり得る。

【0041】

1つの実施形態では、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で57℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の10%以上であり得る。

【0042】

1つの実施形態では、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で57℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上であり得る。

【0043】

1つの実施形態では、上記耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20%スクロースを含む20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で65℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の10%以上であり得る。

【0044】

1つの実施形態では、上記耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20%スクロースを含む20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で65℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上であり得る。

【0045】

1つの実施形態では、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、少なくとも上記T47に相当する位置において、上記天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有する。

【0046】

1つの実施形態では、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、少なくとも上記D249に相当する位置において、上記天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有する。

【0047】

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを調製する方法は、第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む第一の核酸分子を改変して、改変塩基配列を含む第二の核酸分子を得る工程；該第二の核酸分子を含む発現ベクターを作製する工程；該発現ベクターを細胞に導入して耐熱化スクロースホスホリラーゼを発現させる工程；および該発現された耐熱化スクロースホスホリラーゼを回収する工程を包含し、該耐熱化スクロースホスホリラーゼは、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置、62位セリン(S62)に相当する位置、77位チロシン(Y77)に相当する位置、128位バリン(V128)に相当する位置、140位リジン(K140)に相当する位置、144位グルタミン(Q144)に相当する位置、155位アスパラギン(N155)に相当する位置および249位アスパラギン酸(D249)に相当する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置において、該第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を有し、かつ該耐熱化スクロースホスホリラーゼを20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で55℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上である。

【0048】

1つの実施形態では、上記第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも40%の同一性を有し得る。

【0049】

1つの実施形態では、上記第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有し得る。

【0050】

1つの実施形態では、上記第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列は、配列番

号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされ得る。

【0051】

1つの実施形態では、上記第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択され得る。

【0052】

1つの実施形態では、上記第一のスクロースホスホリラーゼは、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Oenococcus oeni*、*Bifidobacterium longum*、*Agrobacterium vitis*、*Pseudomonas saccharophila*、*Escherichia coli*および*Listeria innocua*からなる群より選択される細菌由来であり得、より好ましくは*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*、*Leuconostoc mesenteroides*および*Oenococcus oeni*からなる群より選択される細菌由来であり得、そしてさらに好ましくは*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*または*Streptococcus sorbinus*に由来し得る。

【0053】

1つの実施形態では、上記耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で57℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性は、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の10%以上であり得る。

【0054】

1つの実施形態では、上記耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で57℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性は、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上であり得る。

【0055】

1つの実施形態では、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、少なくとも上記T47に相当する位置において、上記第一のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有し得る。

【0056】

1つの実施形態では、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、少なくとも上記D249に相当する位置において、上記第一のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有し得る。

【0057】

本発明の核酸分子は、上記の耐熱化スクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む。

【0058】

本発明のベクターは、上記の核酸分子を含む。

【0059】

本発明の細胞は、上記の核酸分子を含む。

【0060】

本発明のグルコース-1-リン酸の合成方法は、上記の耐熱化スクロースホスホリラーゼ、スクロースおよび無機リン酸を含む反応溶液を反応させて、グルコース-1-リン酸

を生産する工程を包含する。

【0061】

1つの実施形態では、上記反応は、50℃～70℃の温度で行われ得る。

【0062】

本発明のグルコース重合体の合成方法は、上記の耐熱化スクロースホスホリラーゼと、 α -グルコース-1-リン酸を基質とする第二のホスホリラーゼと、スクロースと、プライマーと、無機リン酸またはグルコース-1-リン酸とを含む反応液を反応させて、グルコース重合体を生産する工程を包含する。

【0063】

1つの実施形態では、上記グルコース重合体は、 α -グルカンであり得る。

【0064】

1つの実施形態では、上記第二のホスホリラーゼは、 α -グルカンホスホリラーゼであり得る。

【0065】

1つの実施形態では、上記第二のホスホリラーゼは、セロビオースホスホリラーゼ、セロデキストリンホスホリラーゼ、ラミナリビオースホスホリラーゼ、ラミナリデキストリンホスホリラーゼ、 β -1, 3-グルカンホスホリラーゼおよびトレハロースホスホリラーゼからなる群より選択され得る。

【0066】

1つの実施形態では、上記反応は、50℃～70℃の温度で行なわれ得る。

【発明の効果】

【0067】

本発明によって、高温（例えば60℃以上）で反応可能であり、かつ高温（例えば60℃以上）で活性が非常に高いSP酵素が得られた。この耐熱化により、雑菌汚染および α -グルカンの老化を抑制し、G-1-Pまたは α -グルカンの効率よい製造が可能となった。

【0068】

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼをコードする遺伝子（例えば、*Streptococcus mutans*由来のSPを耐熱化して得られる耐熱化SPをコードする遺伝子）を大腸菌などの中温菌を宿主として高発現させた場合、耐熱性の酵素を含む菌体抽出液を60℃で加熱することにより、宿主菌由来の夾雑酵素を簡単に除去できるという利点を得られる。従って、本発明の方法は、酵素精製においても有利となる。

【0069】

本発明の方法は、*Streptococcus mutans*由来のSPのみに有効というわけではなく、*Streptococcus mutans*由来のSPのアミノ酸構造に対して高い相同性を示す他のSPの耐熱化にも好適に応用できる。従って、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン（T47）に相当する位置、62位セリン（S62）に相当する位置、77位チロシン（Y77）に相当する位置、128位バリン（V128）に相当する位置、140位リジン（K140）に相当する位置、144位グルタミン（Q144）に相当する位置、155位アスパラギン（N155）に相当する位置および249位アスパラギン酸（D249）に相当する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置において、該天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を有する他の生物種由来の耐熱性SPを得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0070】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0071】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

【0072】

(1. スクロースホスホリラーゼ)

本明細書において「スクロースホスホリラーゼ」および「SP」は特に示さない限り互換可能に用いられ、スクロースホスホリラーゼ活性を有する酵素を意味する。スクロースホスホリラーゼは、EC. 2. 4. 1. 7に分類される。スクロースホスホリラーゼによって触媒される反応は、次式により示される:

【0073】

【化1】

スクロース+無機リン酸 ⇌ α-D-グルコース-1-リン酸+D-フルクトース

スクロースホスホリラーゼは、自然界では種々の生物に含まれる。スクロースホスホリラーゼを産生する生物の例としては、*Streptococcus* 属に属する細菌 (例えば、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*、*Streptococcus thermophilus* および *Streptococcus mitis*)、*Leuconostoc mesenteroides*、*Oenococcus oeni*、*Bifidobacterium* sp. (例えば、*Bifidobacterium longum* および *Bifidobacterium adolescentis*)、*Agrobacterium* sp. (例えば、*Agrobacterium vitis*)、*Pseudomonas* sp. (例えば、*Pseudomonas saccharophila*)、*Escherichia coli*、*Listeria* sp. (例えば、*Listeria innocua* および *Listeria monocytogenes*)、*Clostridium* sp.、*Pullularia pullulans*、*Acetobacter xylinum*、*Synecococcus* sp.、*Aspergillus niger*、*Sclerotinea esceritiorum*、および *Chlamydomonas* sp. が挙げられる。スクロースホスホリラーゼを産生する生物はこれらに限定されない。

【0074】

本発明の方法に用いられる天然のスクロースホスホリラーゼは、細菌由来であることが好ましく、中温菌由来であることがより好ましい。しかし、これらのスクロースホスホリラーゼは耐熱性がない。そのため、高温 (例えば、約 50℃~60℃以上) では反応を十分に触媒できない。そのため、細菌由来の SP の反応至適温度に合わせて反応を約 30℃~約 40℃で行うと、雑菌汚染という問題または α-グルカンの老化という問題が生じ、α-グルカンまたは G-1-P を効率よく生産できない。

【0075】

本明細書中では、酵素がある生物に「由来する」とは、その生物から直接単離したことのみを意味するのではなく、その生物を何らかの形で利用することによりその酵素が得られることをいう。例えば、その生物から入手したその酵素をコードする遺伝子を実験室に導入して、その実験室から酵素を単離する場合も、その酵素はその生物に「由来する」という。

【0076】

Streptococcus mutans の天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列番号 1 に示し、そしてアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。*Streptococcus mutans* には、配列番号 2 とは異なるアミノ酸配列を有する天然のスクロースホスホリラーゼも公知である。配列番号 2 のアミノ酸配列を有する SP と、*S. mutans* 由来のこの他の SP とはいずれも、47 位のアミノ酸がトレオニンであり、62 位のアミノ酸がセリンであり、77 位のアミノ酸がチロシンであり、128 位のアミノ酸がバリンであり、140 位のアミノ酸がリジンであり、144 位のアミノ酸がグルタミンであり、そして 155 位のアミノ酸がアスパラギンであるので、これらのスクロースホスホリラーゼはいずれも、耐熱性がほぼ同等である。本明細書中では、「天然の

」スクロースホスホリラーゼは、もともとスクロースホスホリラーゼを産生する細菌から単離されたスクロースホスホリラーゼだけでなく、天然のスクロースホスホリラーゼと同じアミノ酸配列を有する、遺伝子組換えによって得られるスクロースホスホリラーゼをも包含する。

【0077】

*Streptococcus pneumoniae*の天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列番号3に示し、そしてアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0078】

*Streptococcus sorbinus*の天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列番号5に示し、そしてアミノ酸配列を配列番号6に示す。

【0079】

*Leuconostoc mesenteroides*の天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列番号7に示し、そしてアミノ酸配列を配列番号8に示す。

【0080】

*Oenococcus oeni*の天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列番号9に示し、そしてアミノ酸配列を配列番号10に示す。

【0081】

*Bifidobacterium longum*の天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列番号11に示し、そしてアミノ酸配列を配列番号12に示す。

【0082】

*Agrobacterium vitis*の天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列番号13に示し、そしてアミノ酸配列を配列番号14に示す。

【0083】

*Pseudomonas saccharophila*の天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列番号15に示し、そしてアミノ酸配列を配列番号16に示す。

【0084】

*Escherichia coli*の天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列番号17に示し、そしてアミノ酸配列を配列番号18に示す。

【0085】

*Listeria innocua*の天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列番号19に示し、そしてアミノ酸配列を配列番号20に示す。

【0086】

これらの天然のスクロースホスホリラーゼの塩基配列およびアミノ酸配列は例示であり、これらの配列とはわずかに異なる配列を有する改変体（いわゆる、対立遺伝子改変体）が天然に存在し得ることは公知である。本発明においては、例示した配列を有するスクロースホスホリラーゼ以外にも、このような、天然に存在する改変体も耐熱化に用い得る。

【0087】

本発明の方法に用いられる天然のスクロースホスホリラーゼは、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Oenococcus oeni*、*Bifidobacterium longum*、*Agrobacterium vitis*、*Pseudomonas saccharophila*、*Escherichia coli*または*Listeria innocua*に由来することが好ましく、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*、*Leuconostoc mesenteroides*または*Oenococcus oeni*に由来することがより好ましく、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*または*Strepto*

coccus sorbinus、に由来することが最も好ましい。

【0088】

スクロースホスホリラーゼの遺伝子は、既知のスクロースホスホリラーゼの配列を参考にしてプライマーを設計し、スクロースホスホリラーゼ遺伝子を得ようとするゲノムライブラリーを鋳型としてPCRを行うことによって得ることができる。あるいは、既知のSP遺伝子配列情報をもとに、ゲノムライブラリー作製をへることなく、化学合成により直接SP遺伝子を作製することも可能である。遺伝子の合成方法は、例えばTe'oら (FEMS Microbiological Letters, 190巻、13-19頁、2000年) などに記載されている。

【0089】

得られたSP遺伝子は、当業者に周知の方法で、適切なベクターに挿入できる。例えば、大腸菌用のベクターであれば、pMW118 (日本ジーン株式会社製)、pUC18 (タカラバイオ (株) 製)、pKK233-2 (Amersham-Pharmacia-Biotech製) などが使用でき、枯草菌用のベクターであれば、pUB110 (American Type Culture Collectionから購入可能)、pHY300PLK (タカラバイオ (株) 製) などが使用できる。

【0090】

(2. スクロースホスホリラーゼの耐熱化)

本発明の方法は、第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む第一の核酸分子を改変して、改変塩基配列を含む第二の核酸分子を得る工程；該第二の核酸分子を含む発現ベクターを作製する工程；該発現ベクターを細胞に導入して耐熱化スクロースホスホリラーゼを発現させる工程；および該発現された耐熱化スクロースホスホリラーゼを回収する工程を包含する。

【0091】

(2. 1 天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子の単離)

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子もまた、本発明の範囲内にある。このような核酸分子は、本明細書の開示に基づいて、当該分野で公知の方法を用いて得ることができる。

【0092】

天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子は、上記のような自然界に存在する、スクロースホスホリラーゼを産生する細菌から直接単離され得る。

【0093】

例えば、まず、*Streptococcus mutans* などから天然のスクロースホスホリラーゼが単離される。*Streptococcus mutans* のスクロースホスホリラーゼについての手順を例示すると、最初に、*Streptococcus mutans* を適切な培地 (例えば、LB培地) 中に接種し、振盪させながら37℃で一晩培養する。次いで、この培養液を遠心分離して、*Streptococcus mutans* の菌体を収集する。得られた菌体を、20mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 中に懸濁し、次いで超音波処理により破碎し、菌体破碎液を得る。次いで、この菌体破碎液にスクロースを加えて、10%スクロースを含む菌体破碎液を得る。この菌体破碎液を、55℃の水浴中で30分間加熱する。加熱後、この菌体破碎液を、遠心機 (ベックマン社製、AVANTI J-25I) を用いて遠心分離し、不溶性のタンパク質などを除去し、上清を得る。得られた上清を、あらかじめ平衡化しておいた陰イオン交換樹脂Q-Sepharoseに流してスクロースホスホリラーゼを樹脂に吸着させる。樹脂を、100mM塩化ナトリウムを含む緩衝液で洗浄して不純物を除去する。続いて、300mM塩化ナトリウムを含む緩衝液でスクロースホスホリラーゼを溶出させ、*Streptococcus mutans* 由来スクロースホスホリラーゼ酵素液とする。

【0094】

通常、この段階でトリプシン処理に用い得るスクロースホスホリラーゼ含有溶液になる

が、さらなる精製を必要とする場合がある。このような場合、必要に応じて、Sepha c r y l S-200HR (ファルマシア社製) などを用いたゲルフィルトレーションクロマトグラフィーによる分画、Phenyl-TOYOPEARL 650M (東ソー社製) などを用いた疎水クロマトグラフィーによる分画を組み合わせることにより、精製 *Streptococcus mutans* 由来スクロースホスホリラーゼ含有溶液を得ることができる。他の細菌種からのスクロースホスホリラーゼの精製も同様に行い得る。

【0095】

このようにして得た精製スクロースホスホリラーゼをトリプシン処理して、得られるトリプシン処理断片をHPLCにより分離し、分離されたいずれかのペプチド断片のN末端のアミノ酸配列を、ペプチドシーケンサーにより同定する。次いで、同定したアミノ酸配列をもとに作製した合成オリゴヌクレオチドプローブを用いて、適切なゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子(遺伝子ともいう)を得ることができる。オリゴヌクレオチドプローブおよびDNAライブラリーを調製するための、ならびに核酸のハイブリダイゼーションによりそれらをスクリーニングするための基本的な戦略は、当業者に周知である。例えば、Sambrookら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989); *DNA Cloning*, 第IおよびII巻(D. N. Glover編 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait編 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins編 1984)を参照のこと。

【0096】

あるいは、既知の種のスクロースホスホリラーゼの塩基配列に対する相同性に基づいて、この塩基配列の少なくとも一部を含む核酸プローブを用いたハイブリダイゼーションによってスクリーニングして、別種のスクロースホスホリラーゼの塩基配列を含む核酸分子を獲得することもできる。このような方法は当該分野で公知である。

【0097】

あるいは、種々のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列において保存された領域に対応する縮重プライマーを作製して、PCRによってスクロースホスホリラーゼの塩基配列を獲得することも可能である。このような方法は当該分野で公知である。

【0098】

ゲノムライブラリーをスクリーニングする場合、得られた核酸分子は、当業者に周知の方法を用いてサブクローニングされ得る。例えば、目的の遺伝子を含むλファージと、適切な大腸菌と、適切なヘルパーファージとを混合することにより、容易に目的の遺伝子を含有するプラスミドを得ることができる。その後、プラスミドを含有する溶液を用いて、適切な大腸菌を形質転換することにより、目的の遺伝子をサブクローニングし得る。得られた形質転換体を培養して、例えばアルカリSDS法によりプラスミドDNAを得、目的の遺伝子の塩基配列を決定し得る。塩基配列を決定する方法は、当業者に周知である。さらに、DNAフラグメントの塩基配列を基に合成されたプライマーを用い、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus sorbinus*などのゲノムDNAなどを鋳型に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて直接スクロースホスホリラーゼ遺伝子を増幅することもできる。

【0099】

本明細書において「核酸分子」は、天然のヌクレオチドのみからなっているもよく、非天然のヌクレオチドを含んでもよく、非天然のヌクレオチドのみからなっているもよい。非天然のヌクレオチドの例としては、誘導体ヌクレオチド(ヌクレオチドアナログともいう)が挙げられる。「誘導体ヌクレオチド」および「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野において周

知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸 (PNA) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0100】

(2.2 第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む第一の核酸分子の改変)

第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む第一の核酸分子を改変して、改変塩基配列を含む第二の核酸分子を得る。第一の核酸分子は、上記(2.1)のようにして得た、天然のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子であり得る。第一の核酸分子はまた、天然のスクロースホスホリラーゼの酵素活性と実質的に同様の酵素活性を有する、天然のスクロースホスホリラーゼに対して1もしくは数個またはそれを超えるアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子であり得る。このような、天然のスクロースホスホリラーゼに対してアミノ酸が置換および付加されたスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列の例として、配列番号23の塩基配列を示す。この塩基配列は、天然の塩基配列(すなわち、配列番号1の塩基配列)に対して、3'末端の4塩基が置換されており、さらに3'末端に18塩基が付加されている。この塩基配列によってコードされるアミノ酸配列(配列番号24のアミノ酸配列)は、天然のアミノ酸配列(すなわち、配列番号2のアミノ酸配列)に対して、C末端の2アミノ酸が置換されており、さらにC末端に6アミノ酸が付加されているが、酵素活性は、天然のスクロースホスホリラーゼと実質的に同様である。「実質的に同様の酵素活性を有する」とは、天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列に対してアミノ酸の置換、欠失もしくは付加を有するスクロースホスホリラーゼを、天然のスクロースホスホリラーゼと同一条件下で測定したときの酵素活性が、天然のスクロースホスホリラーゼの酵素活性の±20%以内であることをいう。好ましくは±10%以内、より好ましくは±5%以内である。

【0101】

改変は、当該分野で周知の方法を用いて、例えば、部位特異的変異誘発法、変異原を用いた変異誘発法(対象遺伝子を亜硝酸塩などの変異剤で処理すること、紫外線処理を行うこと)、エラーブローンPCRを行うことなどによって行われ得る。目的の変異を得やすい点から、部位特異的変異誘発を用いることが好ましい。部位特異的変異誘発を用いれば、目的とする部位で目的とする改変を導入することができるからである。あるいは、目的とする配列をもつ核酸分子を直接合成してもよい。そのような化学合成の方法は、当該分野において周知である。

【0102】

本発明の方法においては、第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子は、改変核酸分子によってコードされる耐熱化スクロースホスホリラーゼが、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置、62位セリン(S62)に相当する位置、77位チロシン(Y77)に相当する位置、128位バリン(V128)に相当する位置、140位リジン(K140)に相当する位置、144位グルタミン(Q144)に相当する位置、155位アスパラギン(N155)に相当する位置および249位アスパラギン酸(D249)に相当する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置において、該天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を有するように改変される。好ましくは、第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子は、改変核酸分子によってコードされる耐熱化スクロースホスホリラーゼの、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置、62位セリン(S62)に相当する位置、77位チロシン(Y77)に相当する位置、128位バリン(V128)に相当する位置、140位リジン(K140)に相当する位置、144位グルタミン(Q144)に相当する位置、155位アスパラギン(N155)に相当する位置および249位アスパラギン酸(D249)に相当す

る位置からなる群より選択される少なくとも2つの位置において、より好ましくは少なくとも3つの位置において、さらに好ましくは少なくとも4つの位置において、なお好ましくは少なくとも5つの位置において、なおさらに好ましくは少なくとも6つの位置において、特に好ましくは少なくとも7つの位置において、最も好ましくは8つ全ての位置において、上記天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるように改変される。

【0103】

1つの実施形態では、第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子は少なくとも、改変核酸分子によってコードされる耐熱化スクロースホスホリラーゼの、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン (T47) に相当する位置において上記天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるように改変される。

【0104】

1つの実施形態では、第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子は少なくとも、改変核酸分子によってコードされる耐熱化スクロースホスホリラーゼの、配列番号2のアミノ酸配列の249位アスパラギン酸 (D249G) に相当する位置において上記天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるように改変される。

【0105】

1つの実施形態では、第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子は少なくとも、改変核酸分子によってコードされる耐熱化スクロースホスホリラーゼにおいて、配列番号2のアミノ酸配列の以下の組み合わせの位置に相当する位置において上記天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるように改変される:

(1) 47位トレオニン (T47) に相当する位置と、62位セリン (S62) に相当する位置と、77位チロシン (Y77) に相当する位置と、128位バリン (V128) に相当する位置と、140位リジン (K140) に相当する位置と、144位グルタミン (Q144) に相当する位置と、155位アスパラギン (N155) に相当する位置と、249位アスパラギン酸 (D249) に相当する位置との組合せ (すなわち、8箇所全て) ;

(2) 47位トレオニン (T47) に相当する位置と、62位セリン (S62) に相当する位置と、77位チロシン (Y77) に相当する位置と、128位バリン (V128) に相当する位置と、144位グルタミン (Q144) に相当する位置と、155位アスパラギン (N155) に相当する位置と、249位アスパラギン酸 (D249) に相当する位置との組合せ) ;

(3) T47に相当する位置と、V128に相当する位置と、Q144に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ ;

(4) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、Q144に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ ;

(5) T47に相当する位置と、V128に相当する位置と、Q144に相当する位置と、N155に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ ;

(6) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、V128に相当する位置と、N155に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ ;

(7) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、Y77に相当する位置と、V128に相当する位置と、K140に相当する位置と、Q144に相当する位置との組合せ ;

(8) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、Y77に相当する位置と、V128に相当する位置と、Q144に相当する位置と、N155に相当する位置との組合せ ;

(9) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、Q144に相当する位置と、N155に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ ;

(10) T47に相当する位置と、Y77に相当する位置と、K140に相当する位置と、Q144に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ ;

(11) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、Y77に相当する位置と

、Q144に相当する位置と、N155に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ；

(12) V128に相当する位置と、Q144に相当する位置と、N155に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ；

(13) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、V128に相当する位置と、Q144に相当する位置と、N155に相当する位置との組合せ；

(14) V128に相当する位置と、N155に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ；

(15) S62に相当する位置と、V128に相当する位置と、Q144に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ；

(16) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、K140に相当する位置と、N155に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ；

(17) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ；

(18) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、N155に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ；

(19) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、Y77に相当する位置と、V128に相当する位置と、Q144に相当する位置との組合せ；

(20) Y77に相当する位置と、V128に相当する位置と、N155に相当する位置との組合せ；

(21) Y77に相当する位置と、K140に相当する位置と、Q144に相当する位置と、D249に相当する位置との組合せ；

(22) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、V128に相当する位置との組合せ；

(23) T47に相当する位置と、S62に相当する位置と、Q144に相当する位置と、N155に相当する位置との組合せ；および

(24) T47に相当する位置とD249に相当する位置との組合せ。

【0106】

本明細書中で用いられる「配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置」とは、対象のアミノ酸配列と配列番号2のアミノ酸配列とを相同性が最も高くなるように、必要に応じて一方の配列にギャップを挿入して並べた場合に、配列番号2の47位トレオニンと並置される位置をいう。なお、配列番号2にギャップが挿入された場合にそのギャップはアミノ酸残基の数として数えない。より好ましくは、GENETYX-WIN Ver. 4.0のマルチプルアライメントにおいて、デフォルトのスコアテーブルを用い、GAP Penalty (Peptide) : Insert=-8、Extend=-3、gap Extend on top position: 設定あり(チェック)、Match Mode: Local Matchの条件で配列番号2のアミノ酸配列と対象のアミノ酸配列とをアライメントした場合に、配列番号2の47位トレオニンと並置される位置をいう。アミノ酸についてのデフォルトのスコアテーブルを以下の表2に示す。

【0107】

[illegible]

【0 1 0 8】

【0 1 0 9】

$$\begin{array}{rcll} a & = & a_1 & a_2 & a_3 & \dots & a_m \\ b & = & b_1 & b_2 & b_3 & \dots & b_m \end{array}$$
$$-g = s(a_i, \phi) = s(\phi, b_j) \circ$$

アライメントのスコアを得るための式は以下のとおりである：

【0 1 1 1】

【数2】

$$G(0, 0) = 0$$

$$G(i, 0) = i(-g)$$

$$G(0, j) = j(-g)$$

$$-gk = -[\alpha + \beta(k-1)]$$

$$E(i, j) = \max[G(i-1, j) - \alpha, E(i-1, j) - \beta]$$

$$F(i, j) = \max[G(i, j-1) - \alpha, F(i, j-1) - \beta]$$

$$G(i, j) = \max[E(i, j), G(i-1, j-1) + s(a_i, b_j), F(i, j)]$$

α はGAP挿入のペナルティであり、 β はGAP伸長のペナルティである。E、F、Gはスコア行列であり、これを基にパス行列が作成される。

【0112】

62位セリン(S62)に相当する位置、77位チロシン(Y77)に相当する位置、128位バリン(V128)に相当する位置、140位リジン(K140)に相当する位置、144位グルタミン(Q144)に相当する位置、155位アスパラギン(N155)に相当する位置、および249位アスパラギン酸(D249)に相当する位置についても同様に解釈される。

【0113】

GENETYX-WIN Ver. 4.0のマルチプルアライメントにおいて、上記の条件で、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20を配列番号2とアライメントした場合、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置にはトレオニン、イソロイシン、フェニルアラニンまたはセリンが並置された。62位セリン(S62)に相当する位置には、セリン、アラニン、プロリンまたはグルタミン酸が並置された。77位チロシン(Y77)に相当する位置には、チロシン、バリン、ロイシン、ヒスチジン、セリンまたはアラニンが並置された。128位バリン(V128)に相当する位置には、バリン、イソロイシンまたはロイシンが並置された。140位リジン(K140)に相当する位置には、リジン、メチオニン、トレオニン、イソロイシン、フェニルアラニンまたはグルタミンが並置された。144位グルタミン(Q144)に相当する位置には、バリン、トレオニン、アルギニン、アスパラギン酸、リジン、セリンまたはグルタミンが並置された。155位アスパラギン(N155)に相当する位置には、アスパラギン、トレオニンまたはバリンが並置された。249位アスパラギン酸(D249)に相当する位置には、アスパラギン酸、グリシン、バリンまたはグルタミン酸が並置された。このアライメントの結果を図1A～図1Cに示す。図1A～図1Cにおいて、「StMSP」は、*Streptococcus mutans*由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す。「StPSP」は、*Streptococcus pneumoniae*由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す。「StSSP」は、*Streptococcus sorbinus*由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す。「LeuSP」は、*Leuconostoc mesenteroides*由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す。「OenSP」は、*Oenococcus oeni*由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す。「BifSP」は、*Bifidobacterium longum*由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す。「AgrSP」は、*Agrobacterium vitis*由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す。「PseuSP」は、*Pseudomonas saccharophila*由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す。「EcoSP」は、*Escherichia coli*由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す。「ListSP」は、*Listeria innocua*由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す。

【0114】

本明細書では配列の同一性は、GENETYX-WIN Ver. 4.0(株式会社ゼ

ネティックス) のマキシマムマッチングを用いて算出される。このプログラムは、解析対象となる配列データに対して、比較対照となる配列データとを置き換えや欠損を考慮しながら、配列間で一致するアミノ酸対が最大になるように並べ替え、その際、一致 (Matches)、不一致 (Mismatches)、ギャップ (Gaps) についてそれぞれ得点を与え合計を算出して最小となるアライメントを出力しその際の同一性を算出する (参考文献: Takashi, K., および Gotoh, O. 1984. Sequence Relationships among Various 4.5 S RNA Species J. Biochem. 92:1173-1177)。本明細書では配列の同一性は、GENETYX-WIN Ver. 4.0 のマキシマムマッチングを Matches=-1; Mismatches=1; Gaps=1; *N+=2 の条件で用いて算出される。

【0115】

GENETYX-WIN Ver. 4.0 のマキシマムマッチングを用いて、Matches=-1; Mismatches=1; Gaps=1; *N+=2 の条件で、Streptococcus mutans (配列番号2)、Streptococcus pneumoniae (配列番号4)、Streptococcus sorbinus (配列番号6)、Leuconostoc mesenteroides (配列番号8)、Oenococcus oeni (配列番号10)、Bifidobacterium longum (配列番号12)、Agrobacterium vitis (配列番号14)、Pseudomonas saccharophila (配列番号16)、Escherichia coli (配列番号18) および Listeria innocua (配列番号20) の間で相互にアミノ酸配列をアライメントした場合に得られた同一性の値を以下の表3に示す。

【0116】

【表3】

	アミノ酸数	StMSP	StPSP	StSSP	LeuSP	OenSP	BifSP	AgrSP	PseuSP	EcoSP	ListSP
<i>Streptococcus mutans</i>	481	StMSP 100	83.8	81.9	65.7	64.5	38.0	38.1	36.3	28.7	27.0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	478	StPSP 83.8	100	79.2	66.7	63.8	36.1	37.7	35.3	28.0	27.0
<i>Streptococcus sorbinus</i>	481	StSSP 81.9	79	100	65.1	65.4	36.5	39.3	36.4	27.1	27.0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	490	LeuSP 65.7	66.7	65.1	100	72.2	36.0	37.3	34.5	25.4	25.6
<i>Oenococcus oeni</i>	489	OenSP 64.5	63.8	65.4	72.2	100	35.5	38.6	35.1	26.5	26.2
<i>Bifidobacterium longum</i>	508	BifSP 38.0	36.1	36.5	36.0	35.5	100	52.7	50.5	25.6	25.2
<i>Agrobacterium vitis</i>	488	AgrSP 38.1	37.7	39.3	37.3	38.6	52.7	100	56.3	26.4	27.3
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	497	PseuSP 36.3	35.3	36.4	34.5	35.1	50.5	56.3	100	27.7	26.2
<i>Escherichia coli</i>	559	EcoSP 28.7	28.0	27.1	25.4	26.5	25.6	26.4	27.7	100	53.3
<i>Listeria innocua</i>	566	ListSP 27.0	27.0	27.0	25.6	26.2	25.2	27.3	26.2	53.8	100

例えば、*Streptococcus pneumoniae*由来のスクロースホスホリラーゼにおいては、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置は、配列番号4のアミノ酸配列の47位であり、62位セリン(S62)に相当す

る位置は、配列番号4のアミノ酸配列の62位であり、77位チロシン(Y77)に相当する位置は、配列番号4のアミノ酸配列の77位であり、128位バリン(V128)に相当する位置は、配列番号4のアミノ酸配列の128位であり、140位リジン(K140)に相当する位置は、配列番号4のアミノ酸配列の140位であり、144位グルタミン(Q144)に相当する位置は、配列番号4のアミノ酸配列の144位であり、155位アスパラギン(N155)に相当する位置は、配列番号4のアミノ酸配列の155位であり、そして249位アスパラギン酸(D249)に相当する位置は、配列番号4のアミノ酸配列の249位である。

【0117】

例えば、*Streptococcus sorbinus*由来のスクロースホスホリラーゼにおいては、配列番号2のアミノ酸配列のT47に相当する位置は、配列番号6のアミノ酸配列の47位であり、S62に相当する位置は、配列番号6のアミノ酸配列の62位であり、Y77に相当する位置は、配列番号6のアミノ酸配列の77位であり、V128に相当する位置は、配列番号6のアミノ酸配列の128位であり、140位リジン(K140)に相当する位置は、配列番号6の140位であり、Q144に相当する位置は、配列番号6のアミノ酸配列の144位であり、N155に相当する位置は、配列番号6のアミノ酸配列の155位であり、そしてD249に相当する位置は、配列番号6のアミノ酸配列の249位である。

【0118】

例えば、*Leuconostoc mesenteroides*由来のスクロースホスホリラーゼにおいては、配列番号2のアミノ酸配列のT47に相当する位置は、配列番号8のアミノ酸配列の47位であり、S62に相当する位置は、配列番号8のアミノ酸配列の62位であり、Y77に相当する位置は、配列番号8のアミノ酸配列の77位であり、V128に相当する位置は、配列番号8のアミノ酸配列の131位であり、140位リジン(K140)に相当する位置は、配列番号8の143位であり、Q144に相当する位置は、配列番号8のアミノ酸配列の147位であり、N155に相当する位置は、配列番号8のアミノ酸配列の158位であり、そしてD249に相当する位置は、配列番号8のアミノ酸配列の252位である。

【0119】

例えば、*Oenococcus oeni*由来のスクロースホスホリラーゼにおいては、配列番号2のアミノ酸配列のT47に相当する位置は、配列番号10のアミノ酸配列の47位であり、S62に相当する位置は、配列番号10のアミノ酸配列の62位であり、Y77に相当する位置は、配列番号10のアミノ酸配列の77位であり、V128に相当する位置は、配列番号10のアミノ酸配列の128位であり、K140に相当する位置は、配列番号10のアミノ酸配列の140位であり、Q144に相当する位置は、配列番号10のアミノ酸配列の144位であり、N155に相当する位置は、配列番号10のアミノ酸配列の155位であり、そしてD249に相当する位置は、配列番号10のアミノ酸配列の249位である。

【0120】

例えば、*Bifidobacterium longum*由来のスクロースホスホリラーゼにおいては、配列番号2のアミノ酸配列のT47に相当する位置は、配列番号12のアミノ酸配列の46位であり、S62に相当する位置は、配列番号12のアミノ酸配列の63位であり、Y77に相当する位置は、配列番号12のアミノ酸配列の78位であり、V128に相当する位置は、配列番号12のアミノ酸配列の128位であり、K140に相当する位置は、配列番号12のアミノ酸配列の140位であり、Q144に相当する位置は、配列番号12のアミノ酸配列の144位であり、N155に相当する位置は、配列番号12のアミノ酸配列の154位であり、そしてD249に相当する位置は、配列番号12のアミノ酸配列の247位である。

【0121】

例えば、*Agrobacterium vitis*由来のスクロースホスホリラーゼに

においては、配列番号2のアミノ酸配列のT47に相当する位置は、配列番号14のアミノ酸配列の46位であり、S62に相当する位置は、配列番号14のアミノ酸配列の63位であり、Y77に相当する位置は、配列番号14のアミノ酸配列の78位であり、V128に相当する位置は、配列番号14のアミノ酸配列の128位であり、K140に相当する位置は、配列番号14のアミノ酸配列の140位であり、Q144に相当する位置は、配列番号14のアミノ酸配列の144位であり、N155に相当する位置は、配列番号14のアミノ酸配列の155位であり、そしてD249に相当する位置は、配列番号14のアミノ酸配列の248位である。

【0122】

例えば、*Pseudomonas saccharophila*由来のスクロースホスホリラーゼにおいては、配列番号2のアミノ酸配列のT47に相当する位置は、配列番号16のアミノ酸配列の53位であり、S62に相当する位置は、配列番号16のアミノ酸配列の70位であり、Y77に相当する位置は、配列番号16のアミノ酸配列の85位であり、V128に相当する位置は、配列番号16のアミノ酸配列の135位であり、K140に相当する位置は、配列番号16のアミノ酸配列の144位であり、Q144に相当する位置は、配列番号16のアミノ酸配列の151位であり、N155に相当する位置は、配列番号16のアミノ酸配列の162位であり、そしてD249に相当する位置は、配列番号16のアミノ酸配列の255位である。

【0123】

例えば、*Escherichia coli*由来のスクロースホスホリラーゼにおいては、配列番号2のアミノ酸配列のT47に相当する位置は、配列番号18のアミノ酸配列の93位であり、S62に相当する位置は、配列番号18のアミノ酸配列の104位であり、Y77に相当する位置は、配列番号18のアミノ酸配列の123位であり、V128に相当する位置は、配列番号18のアミノ酸配列の164位であり、K140に相当する位置は、配列番号18のアミノ酸配列の178位であり、Q144に相当する位置は、配列番号18のアミノ酸配列の180位であり、N155に相当する位置は、配列番号18のアミノ酸配列の191位であり、そしてD249に相当する位置は、配列番号18のアミノ酸配列の290位である。

【0124】

例えば、*Listeria innocua*由来のスクロースホスホリラーゼにおいては、配列番号2のアミノ酸配列のT47に相当する位置は、配列番号20のアミノ酸配列の91位であり、S62に相当する位置は、配列番号20のアミノ酸配列の106位であり、Y77に相当する位置は、配列番号20のアミノ酸配列の121位であり、V128に相当する位置は、配列番号20のアミノ酸配列の162位であり、K140に相当する位置は、配列番号20のアミノ酸配列の176位であり、Q144に相当する位置は、配列番号20のアミノ酸配列の178位であり、N155に相当する位置は、配列番号20のアミノ酸配列の189位であり、そしてD249に相当する位置は、配列番号20のアミノ酸配列の288位である。

【0125】

配列表の配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18または配列番号20に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸分子に対して改変を行って得られる改変塩基配列を含む核酸分子は、本発明の範囲内にある。

【0126】

配列表の配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17または配列番号19に示される塩基配列を含む核酸分子に対して改変を行って得られる改変塩基配列を含む核酸分子は、本発明の範囲内にある。

【0127】

配列表の配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号

12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも40%（好ましくは少なくとも60%）の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸分子に対して改変を行って得られる改変塩基配列を含む核酸分子は、本発明の範囲内にある。

【0128】

本明細書において（例えば、アミノ酸配列、塩基配列など）の配列の「同一性」とは、2つの配列の間で同一のアミノ酸（塩基配列を比較する場合は塩基）の出現する程度をいう。一般に、2つのアミノ酸または塩基の配列を比較して、付加または欠失を含み得る最適な様式で整列されたこれら2つの配列を比較することによって決定される。同一性パーセントは、アミノ酸（塩基配列を比較する場合は塩基）がこの2つの配列間で同一である位置の数を決定し、比較した位置の総数で同一の位置の数を除算し、そしてこれら2つの配列間の同一性パーセントを得るために、得られた結果に100を掛けることによって算出される。

【0129】

例示として、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを得るために用いられる天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列は、ある実施形態では、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列（すなわち、対照アミノ酸配列）と同一、すなわち、100%同一であってもよく、別の実施形態では、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18および配列番号20からなる群より選択されるアミノ酸配列（すなわち、対照アミノ酸配列）と同一、すなわち、100%同一であってもよく、あるいはこのアミノ酸配列は、対照アミノ酸配列と比較してある一定の数までアミノ酸が変化していてもよい。このような変化は、少なくとも1個のアミノ酸の欠失、保存および非保存置換を含む置換、または挿入からなる群より選択され得る。この変化は対照アミノ酸配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端の位置で生じててもよく、またはこれら末端以外のどの位置で生じててもよい。アミノ酸残基の変化は、1残基づつ点在していてもよく、数残基連続していてもよい。

【0130】

同様に、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを得るために用いられる天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列は、これらの対照アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（すなわち、対照塩基配列）と比較してある一定の数まで変化していてもよい。このような変化は、少なくとも1個のヌクレオチドの欠失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入からなる群より選択され得る。この変化は対照塩基配列の5'末端もしくは3'末端の位置で生じててもよく、またはこれら末端以外のどの位置で生じててもよい。塩基の変化は、1塩基づつ点在していてもよく、数塩基連続していてもよい。

【0131】

塩基の変化は、そのコード配列において、ノンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト変異を生じ得、このような変化をした後の塩基配列によりコードされるSPに変化をもたらし得る。

【0132】

2つのアミノ酸配列を直接比較する場合、そのアミノ酸配列間でアミノ酸が、代表的には少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、さらに好ましくは少なくとも50%、特に好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であることが好ましい。

【0133】

天然の酵素または核酸分子としてはまた、本明細書において具体的に記載された第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列または第一のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列（例えば、配列番号1、2など）に対して同一ではないが相同性のある配

列を有するものもまた使用され得る。天然の酵素または核酸分子に対して相同性を有するそのような酵素または核酸分子としては、例えば、GENETYX-WIN Ver. 4.0のマキシマムマッチングにおいて、上記の条件で用いて比較した場合に、比較対象の配列に対して、核酸の場合、少なくとも約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%の同一性を有する塩基配列を含む核酸分子が挙げられ、そして酵素の場合、少なくとも約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%または約99%の同一性を有するアミノ酸配列を有する酵素が挙げられるがそれらに限定されない。

【0134】

配列表の配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17および配列番号19からなる群より選択される塩基配列からなる核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子に対して改変を行って得られる改変塩基配列を含む核酸分子は、本発明の範囲内にある。配列表の配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17および配列番号19からなる群より選択される塩基配列からなる核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子に対して改変を行って得られる改変塩基配列を含む核酸分子もまた、本発明の範囲内にある。当業者は、所望のスクロースホスホリラーゼ遺伝子を容易に選択することができる。

【0135】

本明細書中で使用する用語「ストリンジェントな条件」とは、特異的な配列にはハイブリダイズするが、非特異的な配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件の設定は、当業者に周知であり、例えば、Molecular Cloning (Sambrookら、前出)に記載される。具体的には、例えば、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、50%ホルムアミド、5×SSC (750mM NaCl、75mM クエン酸三ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハルト溶液 (0.2% BSA、0.2% Ficoll 400および0.2% ポリビニルピロリドン)、10% 硫酸デキストラン、および20 μg/ml 変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中での65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄するという条件を用いることにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。

【0136】

本発明の方法で用いられる改変核酸分子は、第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子に対して保存的に改変された核酸分子であってもよい。保存的に改変された核酸分子は特定の実施形態では、本発明の目的とする改変以外の保存的改変を有していることが好ましい。「第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を含む核酸分子に対して保存的に改変された核酸分子」とは、第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列が、コードするアミノ酸配列と同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸分子をいう。「第一のスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列がコードするアミノ酸配列と本質的に同一のアミノ酸配列」とは、第一のスクロースホスホリラーゼと本質的に同じ酵素活性を有するアミノ酸配列をいう。遺伝コードの縮重のため、機能的に同一な多数の塩基配列が任意の所定のアミノ酸配列をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、GCAコドンによってアラニンが特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたアラニンを変更することなく、GCC、GCGまたはGCUに変更され得る。同様に、複数のコドンによってコードされ得るアミノ酸に関しては、コドンによってそのアミノ酸が特定される全ての位置で、そのコドンは、コー

ドされた特定のアミノ酸を変更することなく、そのアミノ酸をコードする任意の別のコドンに変更され得る。このような塩基配列の変動は、保存的に改変された変異の1つの種である「サイレント変異」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての塩基配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント改変を包含する。サイレント変異は、コードする核酸が変化しない「サイレント置換」と、そもそも核酸がアミノ酸をコードしない場合を包含する。ある核酸がアミノ酸をコードする場合、サイレント変異は、サイレント置換と同義である。本明細書において「サイレント置換」とは、塩基配列において、あるアミノ酸をコードする塩基配列を、同じアミノ酸をコードする別の塩基配列に置換することをいう。遺伝コード上の縮重という現象に基づき、あるアミノ酸をコードする塩基配列が複数ある場合（例えば、グリシンなど）、このようなサイレント置換が可能である。したがって、サイレント置換により生成した塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、もとのポリペプチドと同じアミノ酸配列を有する。したがって、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼにおいて、本発明の目的とする改変（配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン（T47）に相当する位置、62位セリン（S62）に相当する位置、77位チロシン（Y77）に相当する位置、128位バリン（V128）に相当する位置、140位リジン（K140）に相当する位置、144位グルタミン（Q144）に相当する位置、155位アスパラギン（N155）に相当する位置および249位アスパラギン酸（D249）に相当する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置において、該天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を有するように置換すること）に加えて、塩基配列レベルでは、サイレント置換を含ませることも可能である。当該分野において、核酸中の各コドン（通常メチオニンをコードする唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンをコードする唯一のコドンであるTGGを除く）が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。

【0137】

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列は、発現のために導入される生物におけるコドンの使用頻度にあわせて変更され得る。コドン使用頻度は、その生物において高度に発現される遺伝子での使用頻度を反映する。例えば、大腸菌において発現させることを意図する場合、公開されたコドン使用頻度表（例えば、Sharpら、Nucleic Acids Research 16 第17号、8207頁（1988））に従って大腸菌での発現のために最適にすることができる。

【0138】

（2.3 発現ベクターの作製）

上記のようにして改変された塩基配列を含む核酸分子を用いて、発現ベクターが作製される。特定の核酸配列を用いて発現ベクターを作製する方法は、当業者に周知である。

【0139】

本明細書において核酸分子について言及する場合、「ベクター」とは、目的の塩基配列を目的の細胞へと移入させることができる核酸分子をいう。そのようなベクターとしては、目的の細胞において自律複製が可能であるか、または目的の細胞の染色体中への組み込みが可能で、かつ改変された塩基配列の転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。本明細書において、ベクターはプラスミドであり得る。

【0140】

本明細書において使用される「発現ベクター」とは、改変された塩基配列（すなわち、改変されたスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列）を目的の細胞中で発現し得るベクターをいう。発現ベクターは、改変された塩基配列に加えて、その発現を調節するプロモーターのような種々の調節エレメント、および必要に応じて、目的の細胞中での複製および組換え体の選択に必要な因子（例えば、複製起点（ori）、および薬剤耐性遺

伝子のような選択マーカー)を含む。発現ベクター中では、改変された塩基配列は、転写および翻訳されるように作動可能に連結されている。調節エレメントとしては、プロモーター、ターミネーターおよびエンハンサーが挙げられる。また、発現された酵素を細胞外へ分泌させることが意図される場合は、分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列が、改変された塩基配列の上流に正しいリーディングフレームで結合される。特定の生物(例えば、細菌)に導入するために使用される発現ベクターのタイプ、その発現ベクター中で使用される調節エレメントおよび他の因子の種類が、目的の細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

【0141】

本明細書において使用される「ターミネーター」は、タンパク質コード領域の下流に位置し、塩基配列がmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に参与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に参与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。

【0142】

本明細書において使用される「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、また転写頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。プロモーターの領域は、通常、推定タンパク質コード領域の第1エキソンの上流約2kbp以内の領域であることが多いので、DNA解析用ソフトウェアを用いてゲノム塩基配列中のタンパク質コード領域を予測すれば、プロモーター領域を推定することはできる。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子の上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。好ましくは、推定プロモーター領域は、第一エキソン翻訳開始点から上流約2kbp以内に存在する。

【0143】

本明細書において使用される「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ得る。そのようなエンハンサーは当該分野において周知である。エンハンサーは複数個用いられ得るが1個用いられてもよいし、用いなくともよい。

【0144】

本明細書において使用される「作動可能に連結された(る)」とは、所望の塩基配列が、発現(すなわち、作動)をもたらす転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

【0145】

改変した核酸配列を、上記調節エレメントに作動可能に連結するために、目的のスクロースホスホリラーゼ遺伝子を加工すべき場合がある。例えば、プロモーターとコード領域との間が長すぎて転写効率の低下が予想される場合、またはリボゾーム結合部位と翻訳開始コドンとの間隔が適切でない場合などである。加工の手段としては、制限酵素による消化、BamHI、EcoRIなどのエキソヌクレアーゼによる消化、あるいはM13などの一本鎖DNAまたはPCRを使用した部位特異的変異誘発の導入が挙げられる。

【0146】

(2.4 耐熱化スクロースホスホリラーゼの発現)

次いで、上記のようにして作製された発現ベクターを細胞に導入して耐熱化スクロースホスホリラーゼが発現される。

【0147】

本明細書において酵素の「発現」とは、その酵素をコードする塩基配列が、インビボまたはインビトロで転写および翻訳されて、コードされる酵素が生産されることをいう。

【0148】

発現ベクターを導入する細胞(宿主ともいう)としては、原核生物および真核生物が挙げられる。発現ベクターを導入する細胞は、スクロースホスホリラーゼの発現の容易さ、

培養の容易さ、増殖の速さ、安全性などの種々の条件を考慮して容易に選択され得る。例えば、スクロースホスホリラーゼを高分子量のアミロースの合成に用いる場合、スクロースホスホリラーゼは、夾雑物としてアミラーゼを含まないことが好ましいので、アミラーゼを産生しないかまたは低レベルでしか発現しない細胞を用いることが好ましい。このような細胞の例としては、細菌、真菌などの微生物が挙げられる。より好ましい細胞の例としては、中温菌（例えば、大腸菌、枯草菌）が挙げられる。本明細書において、「中温菌」とは、生育温度が通常の温度環境にある微生物のことであり、特に生育至適温度が20℃～40℃である微生物をいう。細胞は、微生物細胞であってもよいが、植物、動物などの細胞であってもよい。用いる細胞によっては、本発明の酵素は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。植物としては、例えば、双子葉植物、イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシなどの単子葉植物が挙げられるがそれらに限定されない。イネなどの穀物は、貯蔵タンパク質を種子に蓄積する性質を持っており、貯蔵タンパク質系を用いて、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを種子に蓄積するように発現させることが可能である（特開2002-58492号明細書を参照のこと）。

【0149】

本発明の方法において、発現ベクターを細胞に導入する技術は、当該分野で公知の任意の技術であり得る。このような技術の例としては、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編（1988）、*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, NY; Sambrook J ら（1987）*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。

【0150】

細胞として植物の細胞を用いる場合、形質転換体を組織または植物体へと再分化する方法は当該分野において周知である。そのような方法の例は、以下に記載される：Rogers ら、*Methods in Enzymology* 118:627-640（1986）；Tabata ら、*Plant Cell Physiol.*, 28:73-82（1987）；Shaw, *Plant Molecular Biology: A practical approach*. IRL press（1988）；Shimamoto ら、*Nature* 338:274（1989）；およびMaliga ら、*Methods in Plant Molecular Biology: A laboratory course*. Cold Spring Harbor Laboratory Press（1995）。木本植物を形質転換する方法については、*Molecular Biology of Woody Plants* (Vol. I, II) (ed. S. Mohan Jain, Subhash C. Minocha), Kluwer Academic Publishers, (2000) に記載されている。また、木本植物を形質転換する方法は、例えば、*Plant Cell Reports*（1999）19:106-110 に詳細に記載されている。従って、当業者は、目的とするトランスジェニック植物に応じて上記周知方法を適宜使用して、形質転換体を再分化させることができる。このようにして得られたトランスジェニック植物には、目的の遺伝子が導入されており、そのような遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような公知の方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

【0151】

発現ベクターが導入されて耐熱化されたスクロースホスホリラーゼを発現する能力を獲得した細胞（形質転換細胞ともいう）を培養することにより、耐熱化されたスクロースホスホリラーゼを細胞に発現させることができる。形質転換細胞の培養条件は、使用する宿主細胞の種類、発現ベクター内の発現調節因子の種類などに応じて、適切に選択される。

例えば、通常の振盪培養方法が用いられ得る。

【0152】

形質転換細胞の培養に用いる培地は、使用する細胞が増殖して目的の耐熱化スクロースホスホリラーゼを発現し得るものであれば特に限定されない。培地には、炭素源、窒素源の他、無機塩、例えば、リン酸、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} などの塩が必要に応じて、適宜混合して、または単独で用いられ得る。また、必要に応じて形質転換細胞の増殖、目的の耐熱化スクロースホスホリラーゼの発現に必要な各種無機物または有機物が添加され得る。

【0153】

形質転換細胞を培養する温度は、用いる形質転換細胞の増殖に適するように選択され得る。通常15℃～60℃である。形質転換株の培養は、耐熱化スクロースホスホリラーゼの発現のために十分な時間続行される。

【0154】

誘導性プロモーターを有する発現ベクターを使用する場合、誘導物質の添加、培養温度の変更、培地成分の調整などにより発現が制御され得る。例えば、ラクトース誘導性プロモーターを有する発現ベクターを使用する場合は、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加することにより発現が誘導され得る。

【0155】

(2.5 耐熱化スクロースホスホリラーゼの回収)

このようにして発現された耐熱化スクロースホスホリラーゼは、次いで回収され得る。例えば、発現された耐熱化スクロースホスホリラーゼが形質転換細胞内に蓄積する場合、形質転換細胞を適切な条件下で培養した後、培養物を遠心分離または濾過することによって細胞を回収し、次いで適切な緩衝液に懸濁する。次いで超音波処理などにより細胞を破碎した後、遠心分離もしくは濾過することによって上清を得る。あるいは、発現された耐熱化スクロースホスホリラーゼが形質転換細胞外に分泌される場合、このようにして形質転換細胞を培養した後、培養物を遠心分離または濾過することによって細胞を分離して上清を得る。耐熱化スクロースホスホリラーゼが形質転換細胞内に蓄積する場合も、形質転換細胞外に分泌される場合も、このようにして得られた耐熱化スクロースホスホリラーゼ含有上清を通常的手段（例えば、塩析法、溶媒沈澱、限外濾過）を用いて濃縮し、耐熱化スクロースホスホリラーゼを含む画分を得る。この画分を濾過、あるいは遠心分離、脱塩処理などの処理を行い粗酵素液を得る。さらにこの粗酵素液を、凍結乾燥、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、晶出などの通常の酵素の精製手段を適宜組み合わせることによって、比活性が向上した粗酵素あるいは精製酵素が得られる。 α -アミラーゼなどの α -グルカン加水分解する酵素が含まれていなければ、粗酵素をそのまま、例えば、高分子量 α -グルカンの製造に用い得る。

【0156】

上述のようにして耐熱化スクロースホスホリラーゼを生産することにより、天然のスクロースホスホリラーゼの耐熱性を大幅に向上させることが可能となる。また、発現させた耐熱化スクロースホスホリラーゼは、その耐熱性を利用して簡便に精製され得る。簡単に述べると、耐熱化スクロースホスホリラーゼを含む細胞抽出液を60℃程度で加熱処理することにより、夾雑酵素が不溶化する。この不溶化物を遠心分離などで除去して透析処理を行うことにより、精製された耐熱化スクロースホスホリラーゼが得られる。

【0157】

好ましい実施態様では、スクロースホスホリラーゼは、精製段階の任意の段階でスクロース（代表的には約4%～約30%、好ましくは約8%～約30%、より好ましくは約8%～約25%）の存在下で加熱され得る。この加熱工程における溶液の温度は、この溶液を30分間加熱した場合に、加熱前のこの溶液に含まれるスクロースホスホリラーゼの活性の50%以上、より好ましくは80%以上の活性が残る温度であることが好ましい。この温度は好ましくは約50℃～約70℃であり、より好ましくは約55℃～約65℃である。例えば、耐熱化S. mutans由来スクロースホスホリラーゼの場合、この温度は

約50℃～約70℃であることが好ましく、約55℃～65℃であることがより好ましい。加熱が行われる場合、加熱時間は、反応温度を考慮して、スクロースホスホリラーゼの活性を大きく損なうことがない限り、任意の時間で設定され得る。加熱時間は、代表的には約10分間～約90分間、より好ましくは約30分間～約60分間である。

【0158】

(3. 耐熱化スクロースホスホリラーゼ)

(3.1 耐熱化スクロースホスホリラーゼの特徴)

上記のような方法によって得られた本発明の酵素は、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置、62位セリン(S62)に相当する位置、77位チロシン(Y77)に相当する位置、128位バリン(V128)に相当する位置、140位リジン(K140)に相当する位置、144位グルタミン(Q144)に相当する位置、155位アスパラギン(N155)に相当する位置および249位アスパラギン酸(D249)に相当する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置において、該天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を有し、かつ該耐熱化スクロースホスホリラーゼを20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で55℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上である。

【0159】

本発明の酵素は好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン(T47)に相当する位置、62位セリン(S62)に相当する位置、77位チロシン(Y77)に相当する位置、128位バリン(V128)に相当する位置、140位リジン(K140)に相当する位置、144位グルタミン(Q144)に相当する位置、155位アスパラギン(N155)に相当する位置および249位アスパラギン酸(D249)に相当する位置からなる群より選択される少なくとも2つの位置において、より好ましくは少なくとも3つの位置において、さらに好ましくは少なくとも4つの位置において、なお好ましくは少なくとも5つの位置において、殊に好ましくは少なくとも6つの位置において、特に好ましくは少なくとも7つの位置において、最も好ましくは8つ全ての位置において、天然のスクロースホスホリラーゼとは異なるアミノ酸残基を有する。例えば、配列番号2のアミノ酸配列を有するスクロースホスホリラーゼに対して、この8つ全ての位置で置換が行われたアミノ酸配列の例を配列番号22に示し、このアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号21に示す。これらの置換が行われることによって、置換後のスクロースホスホリラーゼは、置換前のスクロースホスホリラーゼと比較して耐熱性の向上が見られる。

【0160】

天然のスクロースホスホリラーゼの上記の8つの位置は、それらの周囲のアミノ酸と一緒にあって、スクロースホスホリラーゼの立体構造の中で、耐熱性に悪影響を与える立体的部分構造を形成していると考えられる。これらの位置の残基を、別のアミノ酸残基に変更することによって、耐熱性が向上する。また、これらの位置の残基は周囲のアミノ酸残基と立体構造的に相互作用しているので、そのアミノ酸残基を置換することに重要な意義がある。例えば、*Streptococcus mutans*由来のスクロースホスホリラーゼの場合は、T47の位置のTをそれ以外に置換することに重要な意義がある。また、例えば、*Escherichia coli*由来のスクロースホスホリラーゼにおいては、T47に相当する位置のアミノ酸はSであるが、Sを他のアミノ酸に置換することに重要な意義があり、例えば、SをTに置換すると置換後の配列は*Streptococcus mutans*由来のスクロースホスホリラーゼに類似した配列になるが、その配列においても耐熱性の向上が見られる。

【0161】

本発明の酵素においては、T47に相当する位置におけるアミノ酸残基は、天然のスクロースホスホリラーゼに見出されるアミノ酸残基以外のアミノ酸であり得る。T47に相

当する位置におけるアミノ酸残基は、セリンであることが最も好ましい。

【0162】

本発明の酵素においては、S62に相当する位置におけるアミノ酸残基は、天然のスクロースホスホリラーゼに見出されるアミノ酸残基以外のアミノ酸であり得る。S62に相当する位置におけるアミノ酸残基は、プロリンであることが最も好ましい。

【0163】

本発明の酵素においては、Y77に相当する位置におけるアミノ酸残基は、天然のスクロースホスホリラーゼに見出されるアミノ酸残基以外のアミノ酸であり得る。Y77に相当する位置におけるアミノ酸残基は、ヒスチジンまたはトリプトファンであることが特に好ましく、ヒスチジンであることが最も好ましい。

【0164】

本発明の酵素においては、V128に相当する位置におけるアミノ酸残基は、天然のスクロースホスホリラーゼに見出されるアミノ酸残基以外のアミノ酸であり得る。V128に相当する位置におけるアミノ酸残基は、ロイシンであることが最も好ましい。

【0165】

本発明の酵素においては、K140に相当する位置におけるアミノ酸残基は、天然のスクロースホスホリラーゼに見出されるアミノ酸残基以外のアミノ酸であり得る。K140に相当する位置におけるアミノ酸残基は、メチオニンまたはシステインであることが特に好ましく、メチオニンであることが最も好ましい。

【0166】

本発明の酵素においては、Q144に相当する位置におけるアミノ酸残基は、天然のスクロースホスホリラーゼに見出されるアミノ酸残基以外のアミノ酸であり得る。Q144に相当する位置におけるアミノ酸残基は、アルギニンまたはリジンであることが特に好ましく、アルギニンであることが最も好ましい。

【0167】

本発明の酵素においては、N155に相当する位置におけるアミノ酸残基は、天然のスクロースホスホリラーゼに見出されるアミノ酸残基以外のアミノ酸であり得る。N155に相当する位置におけるアミノ酸残基は、セリンまたはトレオニンであることが特に好ましく、セリンであることが最も好ましい。

【0168】

本発明の酵素においては、D249に相当する位置におけるアミノ酸残基は、天然のスクロースホスホリラーゼに見出されるアミノ酸残基以外のアミノ酸であり得る。D249に相当する位置におけるアミノ酸残基は、グリシンまたはアラニンであることが特に好ましく、グリシンであることが最も好ましい。

【0169】

本発明の方法において、耐熱化スクロースホスホリラーゼを作製するために、本発明の目的の改変（配列番号2のアミノ酸配列の47位トレオニン（T47）に相当する位置、62位セリン（S62）に相当する位置、77位チロシン（Y77）に相当する位置、128位バリン（V128）に相当する位置、140位リジン（K140）に相当する位置、144位グルタミン（Q144）に相当する位置、155位アスパラギン（N155）に相当する位置および249位アスパラギン酸（D249）に相当する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置において、該天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を有するように置換すること）に加えて、アミノ酸の置換、付加、欠失または修飾を行うことができる。

【0170】

アミノ酸の置換とは、1つのアミノ酸を別の1つのアミノ酸に置き換えることをいう。得られるスクロースホスホリラーゼが、天然のスクロースホスホリラーゼの酵素活性と実質的に同様の酵素活性を有する限り、アミノ酸の置換は、任意の箇所で任意の個数行われ得る。例えば、置換は、好ましくは1～30個行われ得、より好ましくは1～20個行われ得、さらに好ましくは1～10個行われ得、特に好ましくは1～5個行われ得、最も好

ましくは1～3個行われ得る。アミノ酸の置換は、1残基ずつ点在していてもよく、2残基以上連続していてもよい。特に、置換がN末端またはC末端で行われる場合、他の箇所と比較して活性への影響が少ないので、他の箇所への置換より多くのアミノ酸残基を置換してもよい。目的の変異が行われる位置（配列番号2のアミノ酸配列のT47に相当する位置、S62に相当する位置、Y77に相当する位置、V128に相当する位置、K140に相当する位置、Q144に相当する位置、N155に相当する位置およびD249に相当する位置）の付近での置換は、耐熱性に影響を与える可能性があるのであまり好ましくない。

【0171】

アミノ酸の付加とは、もとのアミノ酸配列中のどこかの位置に、1つ以上、例えば、1～30個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特に好ましくは1～5個、最も好ましくは1～3個のアミノ酸を挿入することをいう。アミノ酸の付加はまた、1残基ずつ点在していてもよく、2残基以上連続していてもよい。アミノ酸の付加はまた、特に、N末端またはC末端で行われる場合、他の箇所に比較して活性への影響が少ないので、他の箇所への付加より多くのアミノ酸残基を付加してもよい。例えば1～10個、より好ましくは1～50個、さらにより好ましくは1～30個、特に好ましくは5～30個、最も好ましくは5～10個のアミノ酸残基を付加してもよい。目的の変異が行われる位置の付近での付加は、耐熱性に影響を与える可能性があるのであまり好ましくない。

【0172】

アミノ酸の欠失とは、もとのアミノ酸配列から1つ以上、例えば、1～30個、より好ましくは1～10個、特に好ましくは1～5個、最も好ましくは1～3個のアミノ酸を除去することをいう。アミノ酸の欠失もまた、1残基ずつ点在していてもよく、2残基以上連続していてもよい。特に、欠失がN末端またはC末端で行われる場合、他の箇所に比較して活性への影響が少ないので、他の箇所への欠失より多くのアミノ酸残基を欠失してもよい。目的の変異が行われる位置の付近での欠失は、耐熱性に影響を与える可能性があるのであまり好ましくない。

【0173】

アミノ酸修飾の例としては、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、ペプチド合成方法によって合成されてもよく、このような場合、置換または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸またはアミノ酸アナログであってもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

【0174】

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、スクロースホスホリラーゼとしての酵素活性を有する、酵素アナログであってもよい。本明細書において使用される用語「酵素アナログ」とは、天然の酵素とは異なる化合物であるが、天然の酵素と少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、酵素アナログには、もとの天然の酵素に対して、1つ以上のアミノ酸アナログが付加または置換されているものが含まれる。酵素アナログは、その機能（例えば、スクロースホスホリラーゼ活性）が、もとの天然の酵素の機能と実質的に同様またはそれよりも良好であるように、このような付加または置換がされている。そのような酵素アナログは、当該分野において周知の技術を用いて作製することができる。したがって、酵素アナログは、アミノ酸アナログを含むポリマーであり得る。本明細書において「酵素」は、特に言及しない限り、この酵素アナログを包含する。

【0175】

本明細書において、「アミノ酸」は、天然のアミノ酸であっても、非天然アミノ酸であっても、誘導体アミノ酸であっても、アミノ酸アナログであってもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

【0176】

用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、γ-カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体であるが、D体のアミノ酸を用いた形態もまた本発明の範囲内にある。

【0177】

用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ-フルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。

【0178】

「誘導体アミノ酸」とは、アミノ酸を誘導体化することによって得られるアミノ酸をいう。

【0179】

「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および/または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。

【0180】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に受け入れられた1文字コードにより言及され得る。

【0181】

目的の改変に加えて、天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列に対して1もしくは数個またはそれを超える複数のアミノ酸の置換、付加または欠失による改変を含む耐熱化スクロースホスホリラーゼは、本発明の範囲内にある。このような、目的の改変以外のアミノ酸の改変は、好ましくは保存的改変であり、より好ましくは保存的置換である。また、天然のスクロースホスホリラーゼのN末端またはC末端へのアミノ酸の付加または欠失は、他の部分への置換、付加または欠失に比較して、スクロースホスホリラーゼの酵素活性に対する影響が少ないと考えられる。それゆえ、アミノ酸の置換、付加または欠失は、N末端またはC末端で行われることが好ましい。そのような1もしくは数個またはそれを超えるアミノ酸の置換、付加または欠失を含む耐熱化スクロースホスホリラーゼは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT WO85/00817 (1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0182】

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、当該分野において周知の方法を利用して製造され得る。例えば、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを作成するためのアミ

ノ酸の欠失、置換もしくは付加は、周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができる。部位特異的変異誘発の手法は、当該分野では周知である。例えば、Nucleic Acid Research, Vol. 10, pp. 6487-6500 (1982) を参照のこと。

【0183】

本明細書において、耐熱化スクロースホスホリラーゼについて目的の改変以外に関して用いられるとき、「1もしくは数個またはそれを超える複数のアミノ酸の置換、付加または欠失」または「少なくとも1つのアミノ酸の置換、付加または欠失」とは、スクロースホスホリラーゼの酵素活性が喪失しない、好ましくはその酵素活性が基準となるもの（例えば、天然のスクロースホスホリラーゼ）と同等以上となるような程度の数の置換、付加または欠失をいう。当業者は、所望の性質を有する耐熱化スクロースホスホリラーゼを容易に選択することができる。あるいは、目的とする耐熱化スクロースホスホリラーゼを直接化学合成してもよい。そのような化学合成の方法は、当該分野において周知である。

【0184】

このようにして作製された本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、天然のスクロースホスホリラーゼ（好ましくは、*Streptococcus mutans* または *Streptococcus pneumoniae* 由来のスクロースホスホリラーゼ）のアミノ酸配列に対して、好ましくは約40%、より好ましくは約45%、より好ましくは約50%、より好ましくは約55%、より好ましくは約60%、より好ましくは約65%、より好ましくは約70%、より好ましくは約75%、より好ましくは約80%、より好ましくは約85%、より好ましくは約90%、より好ましくは約95%、そして最も好ましくは約99%の同一性を有する。

【0185】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている（Kyte, J. および Doolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157 (1): 105-132, 1982）。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子（例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など）との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン／シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；スレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（-0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタミン酸（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパラギン酸（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リジン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）である。

【0186】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として実質的に同様の生物学的機能を有するタンパク質（例えば、酵素活性において実質的に等価なタンパク質）を生じさせ得ることは、当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシ

ン(-1.8);チロシン(-2.3);フェニルアラニン(-2.5);およびトリプトファン(-3.4)。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。

【0187】

本発明において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換が挙げられるがこれらに限定されない：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン。

【0188】

(3.2 耐熱性の評価方法)

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で55℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上であることを1つの特徴とする。本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で55℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性は、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の約20%以上であることが好ましく、約30%以上であることがより好ましく、約40%以上であることがより好ましく、約50%以上であることがより好ましく、約55%以上であることがより好ましく、約60%以上であることがより好ましく、約65%以上であることがさらに好ましく、約70%以上であることがいっそう好ましく、約80%以上であることが特に好ましく、約90%以上であることが最も好ましい。

【0189】

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で57℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性は、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の約10%以上であることが好ましく、約20%以上であることがより好ましく、約30%以上であることがより好ましく、約40%以上であることがより好ましく、約50%以上であることがより好ましく、約55%以上であることがより好ましく、約60%以上であることがより好ましく、約65%以上であることがさらに好ましく、約70%以上であることがいっそう好ましく、約80%以上であることが特に好ましく、約90%以上であることが最も好ましい。

【0190】

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で60℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性は、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性の約5%以上であることが好ましく、約10%以上であることがより好ましく、約15%以上であることがより好ましく、約20%以上であることがより好ましく、約25%以上であることがより好ましく、約30%以上であることがより好ましく、約35%以上であることがより好ましく、約40%以上であることがさらに好ましく、約50%以上であることがいっそう好ましく、約60%以上であることが特に好ましく、約70%以上であることが最も好ましい。

【0191】

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを、20%スクロースを含む20mM Tris緩衝液(pH7.0)中で65℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性は、該加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37

℃における酵素活性の10%以上であることがさらに好ましく、約20%以上であることがさらに好ましく、約30%以上であることがさらに好ましく、約40%以上であることがさらに好ましく、約50%以上であることがさらに好ましく、約55%以上であることがさらに好ましく、約60%以上であることがさらに好ましく、約65%以上であることがさらに好ましく、約70%以上であることがいっそう好ましく、約80%以上であることが特に好ましく、約90%以上であることが最も好ましい。なお、本明細書中でスクロースの濃度は、 Weight/Volume で、すなわち、

$(\text{スクロースの重量}) \times 100 / (\text{溶液の容量})$

で計算する。

【0192】

(3.2.1 スクロースホスホリラーゼ (SP) 活性測定法)

スクロースホスホリラーゼの活性単位は、当該分野で公知の任意の方法によって測定され得る。例えば、下記の実施例の1.7に記載の方法によって求められる。

【0193】

(3.2.2 耐熱性の測定法)

耐熱性は、以下の手順に従って測定され得る。

(i) 20%スクロースを含むかまたは含まない、2.5~3.5 U/mlの酵素液 (20 mM Tris緩衝液 (pH 7.0) 中) を55℃、57℃、60℃または65℃で20分間インキュベートする。

(ii) 20分後に取り出した酵素液を氷上に10分間保持して冷却する。

(iii) (ii)の酵素液について、SP活性測定法に従って37℃で酵素活性を測定する。20 mM Tris緩衝液 (pH 7.0) 中で55℃で20分間加熱した後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性 $A_{\text{後}}$ の割合は、加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの37℃における酵素活性 $A_{\text{前}}$ から、 $(A_{\text{後}}) \div (A_{\text{前}}) \times 100$ (%) によって算出される。加熱前の耐熱化スクロースホスホリラーゼの酵素活性 $A_{\text{前}}$ に対する加熱後の耐熱化スクロースホスホリラーゼの酵素活性 $A_{\text{後}}$ の割合を、残存活性ともいう。

【0194】

(3.3 高温条件でのアミロースの収率)

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを用いて、高温条件でアミロースを合成し得る。本明細書中では、「高温条件でアミロースを合成し得る」とは、58.5 mM スクロース、1 mM マルトテトラオース、10 mM 無機リン酸、1 U/ml の *Thermus aquaticus* 由来の α -グルカンホスホリラーゼ (以下の実施例の2.2に従って調製) および1 U/ml の耐熱化スクロースホスホリラーゼを用いて、50℃にて18時間インキュベートすることによってアミロースを合成したときに合成されるアミロースの収率が50%以上であることをいう。この条件でアミロース合成を行った場合、アミロースの収率は好ましくは60%以上であり、より好ましくは70%以上であり、さらに好ましくは80%以上であり、最も好ましくは90%以上である。

【0195】

(3.4 本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼの比活性)

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、高温 (好ましくは55℃) において高い比活性を有する。比活性とは、スクロースホスホリラーゼの重量あたりの活性 (U/g) をいう。

【0196】

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを5%スクロース、250 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で55℃で15分間反応させた場合の比活性は、好ましくは少なくとも20 U/mg 以上であり、より好ましくは少なくとも30 U/mg 以上であり、さらに好ましくは少なくとも40 U/mg であり、さらに好ましくは少なくとも50 U/mg であり、さらに好ましくは少なくとも60 U/mg であり、さらに好ましくは少なくとも70 U/mg であり、さらに好ましくは少なくとも80 U/mg であり、さらに好ましくは

少なくとも90U/mgであり、さらに好ましくは少なくとも100U/mgであり、さらに好ましくは少なくとも110U/mgであり、さらに好ましくは少なくとも120U/mgであり、さらに好ましくは少なくとも130U/mgであり、さらに好ましくは少なくとも140U/mgであり、さらに好ましくは少なくとも150U/mgであり、特に好ましくは少なくとも160U/mgであり、最も好ましくは少なくとも180U/mgである。

【0197】

本発明の耐熱化SP酵素は、天然のSP酵素と比較して、高温での比活性が高くかつ高温での残存活性が高いことが好ましい。

【0198】

(4. 本発明の酵素を用いた α -グルカンの製造方法)

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、 α -グルカンの製造方法において有利に用いられ得る。本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを用いるグルカンの製造方法は、当該分野で公知の任意の α -グルカンの製造方法であり得るが、スクロースとプライマーにスクロースホスホリラーゼと α -グルカンホスホリラーゼを同時に作用させる方法(SP-GP法ともいう)において用いることが好ましい。SP-GP法は、安価な基質を用いて直鎖状グルカンを製造できるという利点を有する。

【0199】

本発明の α -グルカンの合成方法は、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼと、 α -グルカンホスホリラーゼと、スクロースと、プライマーと、無機リン酸またはグルコース-1-リン酸とを含む反応溶液を反応させて、 α -グルカンを生産する工程を包含する。

【0200】

本明細書中では「 α -グルカン」とは、D-グルコースを構成単位とする、糖であって、 α -1, 4-グルコシド結合によって連結された糖単位を少なくとも2糖単位以上有する糖をいう。 α -グルカンは、直鎖状、分岐状または環状の分子であり得る。直鎖状グルカンと α -1, 4-グルカンとは同義語である。直鎖状 α -グルカンでは、 α -1, 4-グルコシド結合によってのみ糖単位の間が連結されている。 α -1, 6-グルコシド結合を1つ以上含む α -グルカンは、分岐状 α -グルカンである。 α -グルカンは、好ましくは、直鎖状の部分がある程度含む。分岐のない直鎖状 α -グルカンがより好ましい。

【0201】

α -グルカンは、場合によっては、分岐の数(すなわち、 α -1, 6-グルコシド結合の数)が少ないことが好ましい。このような場合、分岐の数は、代表的には0~1000個、好ましくは0~1000個、より好ましくは0~500個、さらに好ましくは0~100個、さらに好ましくは0~50個、さらに好ましくは0~25個、さらに好ましくは0個である。

【0202】

本発明の α -グルカンでは、 α -1, 6-グルコシド結合を1としたときの α -1, 6-グルコシド結合の数に対する α -1, 4-グルコシド結合の数の比は、好ましくは1~10000であり、より好ましくは10~5000であり、さらに好ましくは50~1000であり、さらに好ましくは100~500である。

【0203】

α -1, 6-グルコシド結合は、 α -グルカン中に無秩序に分布していてもよいし、均質に分布していてもよい。 α -グルカン中に糖単位で5個以上の直鎖状部分ができる程度の分布であることが好ましい。

【0204】

α -グルカンは、D-グルコースのみから構成されていてもよいし、 α -グルカンの性質を損なわない程度に修飾された誘導体であってもよい。修飾されていないことが好ましい。

【0205】

α -グルカンは、代表的には約 8×10^3 以上、好ましくは約 1×10^4 以上、より好ましくは約 5×10^4 以上、さらに好ましくは約 1×10^5 以上、さらに好ましくは約 6×10^5 以上の分子量を有する。 α -グルカンは、代表的には約 1×10^8 以下、好ましくは約 1×10^7 以下、さらに好ましくは約 5×10^6 以下、さらに好ましくは約 1×10^6 以下の分子量を有する。

【0206】

当業者は、本発明の製造方法で用いられる基質の量、酵素の量、反応時間などを適宜設定することによって所望の分子量の α -グルカンが得られることを容易に理解する。

【0207】

生産効率の良い SP-GP 法は、国際公開第 02/097107 号パンフレットに記載される。

【0208】

本発明の製造方法では、例えば、耐熱化スクロースホスホリラーゼと、 α -グルカンホスホリラーゼと、スクロースと、プライマーと、無機リン酸またはグルコース-1-リン酸と、緩衝剤と、それを溶かしている溶媒とを主な材料として用いる。これらの材料は通常、反応開始時に全て添加されるが、反応の途中でこれらのうちの任意の材料を追加して添加してもよい。本発明の製造方法では、必要に応じて、枝切り酵素、ブランチングエンザイム、4- α -グルカノトランスフェラーゼおよびグリコーゲンデブランチングエンザイムからなる群より選択される酵素を用いることができる。枝切り酵素、ブランチングエンザイム、4- α -グルカノトランスフェラーゼおよびグリコーゲンデブランチングエンザイムからなる群より選択される酵素は、目的とする α -グルカンの構造に応じて、本発明の製造方法の最初から反応溶液中に添加してもよく、途中から反応溶液中に添加してもよい。

【0209】

反応開始時の溶液に含まれるスクロースホスホリラーゼの量は、反応開始時の溶液中のスクロースに対して、代表的には約 0.05~1,000 U/g スクロース、好ましくは約 0.1~500 U/g スクロース、より好ましくは約 0.5~100 U/g スクロースである。スクロースホスホリラーゼの重量が多すぎると、反応中に変性した酵素が凝集しやすくなる場合がある。使用量が少なすぎると、 α -グルカンの収率が低下する場合がある。

【0210】

本明細書中では、「 α -グルカンホスホリラーゼ」とは、 α -グルカンホスホリラーゼ活性を有する酵素を意味する。 α -グルカンホスホリラーゼは、EC 2.4.1.1 に分類される。 α -グルカンホスホリラーゼ活性とは、無機リン酸と α -1,4-グルカンとから、グルコース-1-リン酸および α -1,4-グルカンの部分分解物とを作る反応またはその逆反応を触媒する活性をいう。 α -グルカンホスホリラーゼは、ホスホリラーゼ、スターチホスホリラーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼ、マルトデキストリンホスホリラーゼなどと呼ばれる場合もある。 α -グルカンホスホリラーゼは、加リン酸分解の逆反応である α -1,4-グルカン合成反応をも触媒し得る。反応がどちらの方向に進むかは、基質の量に依存する。生体内では、無機リン酸の量が多いので、 α -グルカンホスホリラーゼは加リン酸分解の方向に反応が進む。無機リン酸の量が少ないと、 α -1,4-グルカンの合成の方向に反応が進む。

【0211】

全ての既知の α -グルカンホスホリラーゼは、活性のためにピリドキサル 5'-リン酸を必要とし、そして類似した触媒機構を共有するようである。異なった起源に由来する酵素は、基質の優先性および調節形態が異なっているが、全ての α -グルカンホスホリラーゼは、多数の α -グルカンホスホリラーゼを含む大きなグループに属する。この大きなグループは、細菌、酵母および動物由来のグリコーゲンホスホリラーゼ、植物由来のデンプンホスホリラーゼ、ならびに細菌由来のマルトオリゴサッカリドホスホリラーゼを含む。

【0212】

α -グルカンホスホリラーゼの α -グルカン合成反応のための最小のプライマー分子はマルトテトラオースであることが報告されている。 α -グルカン分解反応のために有効な最小の基質はマルトペンタオースであることも報告されている。一般に、これらは、 α -グルカンホスホリラーゼに共通の特徴であると考えられていた。しかし、近年、*Thermus thermophilus*由来の α -グルカンホスホリラーゼおよび*Thermococcus litoralis*由来の α -グルカンホスホリラーゼは、他の α -グルカンホスホリラーゼとは異なる基質特異性を有すると報告されている。これらの α -グルカンホスホリラーゼについては、 α -グルカン合成についての最小のプライマーがマルトトリオースであり、 α -グルカン分解についての最小の基質がマルトテトラオースである。

【0213】

α -グルカンホスホリラーゼは、デンプンまたはグリコーゲンを貯蔵し得る種々の植物、動物および微生物中に普遍的に存在すると考えられる。

【0214】

α -グルカンホスホリラーゼを産生する植物の例としては、馬鈴薯（ジャガイモともいう）、サツマイモ、ヤマモ、サトイモ、キャッサバなどの芋類、キャベツ、ホウレンソウなどの野菜類、トウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、アワなどの穀類、ソラマメ、エンドウマメ、ダイズ、アズキ、ウズラマメなどの豆類、*Arabidopsis thaliana*などの実験植物、柑橘類、藻類などが挙げられる。

【0215】

α -グルカンホスホリラーゼを産生する動物の例としては、ヒト、ウサギ、ラット、ブタなどの哺乳類などが挙げられる。

【0216】

α -グルカンホスホリラーゼを産生する微生物の例としては、*Thermus aquaticus*、*Bacillus stearothermophilus*、*E. coli*などが挙げられる。

【0217】

α -グルカンホスホリラーゼを産生する生物はこれらに限定されない。 α -グルカンホスホリラーゼは、天然の α -グルカンホスホリラーゼであっても、天然の α -グルカンホスホリラーゼに変異を導入することによって耐熱性を向上させた耐熱化 α -グルカンホスホリラーゼであってもよい。

【0218】

本発明の方法に用いられる α -グルカンホスホリラーゼは、植物または動物由来であることが好ましく、植物由来であることがより好ましい。一般に、植物由来の天然の α -グルカンホスホリラーゼは、高分子量のアミロースを合成する能力を有する。しかし、これらの α -グルカンホスホリラーゼは耐熱性がない。そのため、高温（例えば、約60℃以上）では反応を触媒できない。そのため、馬鈴薯由来のSPの反応至適温度に合わせて反応を約30℃～約40℃で行うと、雑菌汚染という問題または α -グルカンの老化という問題が生じ、 α -グルカンまたはG-1-Pを効率よく生産できない。

【0219】

α -グルカンホスホリラーゼは、 α -グルカンホスホリラーゼを産生する任意の生物由来であり得る。 α -グルカンホスホリラーゼは、ある程度の耐熱性を有することが好ましい。 α -グルカンホスホリラーゼは、耐熱性が高ければ高いほど好ましい。例えば、 α -グルカンホスホリラーゼを20 mM Tris緩衝液（pH 7.0）中で60℃で10分間加熱した後の α -グルカンホスホリラーゼの37℃における酵素活性が、該加熱前の α -グルカンホスホリラーゼの37℃における酵素活性の20%以上であることが好ましい。

【0220】

α -グルカンホスホリラーゼは、天然の α -グルカンホスホリラーゼであってもよく、

あるいは、耐熱性を向上させるために特定の位置に変異を導入した耐熱化 α -グルカンホスホリラーゼであってもよい。このような位置は、天然の馬鈴薯タイプL α -グルカンホスホリラーゼの成熟アミノ酸配列の39位フェニルアラニン(F39)に相当する位置、135位アスパラギン(N135)に相当する位置および706位トレオニン(T706)に相当する位置からなる群より選択される少なくとも1つの位置であり得る。F39に相当する位置におけるアミノ酸残基は、脂肪族アミノ酸または複素環式アミノ酸であることが好ましく、脂肪族アミノ酸であることがより好ましく、分枝アミノ酸(すなわち、バリン、ロイシンまたはイソロイシン)であることが特に好ましく、ロイシンであることが最も好ましい。N135に相当する位置におけるアミノ酸残基は、脂肪族アミノ酸または複素環式アミノ酸であることが好ましく、脂肪族アミノ酸であることがより好ましく、ヒドロキシアミノ酸(すなわち、セリンまたはトレオニン)であることが特に好ましく、セリンであることが最も好ましい。T706に相当する位置におけるアミノ酸残基は、脂肪族アミノ酸または複素環式アミノ酸であることが好ましく、脂肪族アミノ酸であることがより好ましく、分枝アミノ酸(すなわち、バリン、ロイシンまたはイソロイシン)であることが特に好ましく、イソロイシンであることが最も好ましい。 α -グルカンホスホリラーゼは、これらの3つ全ての位置において改変されていることが好ましい。

【0221】

α -グルカンホスホリラーゼは、馬鈴薯、サツマイモ、ソラマメ、*Arabidopsis thaliana*、ホウレンソウ、トウモロコシ、イネ、小麦または柑橘類に由来することが好ましく、馬鈴薯、サツマイモ、ソラマメ、*Arabidopsis thaliana*、ホウレンソウ、トウモロコシまたはイネに由来することがより好ましく、馬鈴薯に由来することが最も好ましい。 α -グルカンホスホリラーゼは、タイプLの α -グルカンホスホリラーゼに由来することが好ましい。 α -グルカンホスホリラーゼは、馬鈴薯のタイプL、L2もしくはH、サツマイモのタイプLもしくはH、ソラマメのタイプLもしくはH、*Arabidopsis thaliana*のタイプLもしくはH、ホウレンソウのタイプL、トウモロコシのタイプL、イネのタイプLもしくはH、小麦のタイプHまたは柑橘類のタイプHの α -グルカンホスホリラーゼに由来することが好ましく、馬鈴薯のタイプLもしくはL2、サツマイモのタイプL、ソラマメのタイプL、*Arabidopsis thaliana*のタイプL、ホウレンソウのタイプL、トウモロコシのタイプLまたはイネのタイプLの α -グルカンホスホリラーゼに由来することがより好ましく、馬鈴薯のタイプL α -グルカンホスホリラーゼに由来することが最も好ましい。 α -グルカンホスホリラーゼは、耐熱化されていることが好ましい。

【0222】

本発明の方法で用いられる α -グルカンホスホリラーゼは、例えば、以下のようにして調製され得る。まず、 α -グルカンホスホリラーゼを産生する微生物(例えば、細菌、真菌など)を培養する。この微生物は、 α -グルカンホスホリラーゼを直接生産する微生物であってもよい。また、 α -グルカンホスホリラーゼをコードする遺伝子をクローン化し、得られた遺伝子で α -グルカンホスホリラーゼ発現に有利な微生物(例えば、細菌、真菌など)を遺伝子組換えして組換えされた微生物を得、得られた微生物から α -グルカンホスホリラーゼを得てもよい。あるいは、得られた遺伝子を、上記のような特定のアミノ酸位置での改変を含むように改変した後、 α -グルカンホスホリラーゼ発現に有利な微生物(例えば、細菌、真菌など)を遺伝子組換えして組換えされた微生物を得、得られた微生物から耐熱化 α -グルカンホスホリラーゼを得てもよい。例えば、馬鈴薯由来の α -グルカンホスホリラーゼ遺伝子を用いて大腸菌を遺伝子組換えすることによって得られる組換え馬鈴薯 α -グルカンホスホリラーゼの調製方法は、国際公開第02/097107号パンフレットに記載される。

【0223】

α -グルカンホスホリラーゼ遺伝子での遺伝子組換えに用いられる微生物は、 α -グルカンホスホリラーゼの発現の容易さ、培養の容易さ、増殖の速さ、安全性などの種々の条件を考慮して容易に選択され得る。 α -グルカンホスホリラーゼは、夾雑物としてアミラ

ーゼを含まないことが好ましいので、アミラーゼを産生しないかまたは低レベルでしか発現しない微生物（例えば、細菌、真菌など）を遺伝子組換えに用いることが好ましい。 α -グルカンホスホリラーゼの遺伝子組換えのためには、大腸菌または枯草菌のような中温菌を用いることが好ましい。アミラーゼを産生しないかまたは低レベルでしか発現しない微生物（例えば、細菌、真菌など）を用いて産生される α -グルカンホスホリラーゼは、アミラーゼを実質的に含まないため、本発明の方法での使用に好ましい。

【0224】

天然の α -グルカンホスホリラーゼをコードする遺伝子は、耐熱性に寄与する特定の位置のアミノ酸残基を変更するために、当該分野で公知の方法によって改変され得る。このような改変方法の例としては、例えば、部位特異的変異誘発法、変異原を用いた変異誘発法（対象遺伝子を亜硝酸塩などの変異剤で処理すること、紫外線処理を行うこと）、エラープローンPCRを行うことが挙げられる。

【0225】

クローン化した遺伝子での微生物（例えば、細菌、真菌など）の遺伝子組換えは、当業者に周知の方法に従って行われ得る。クローン化した遺伝子を用いる場合、この遺伝子を、構成性プロモーターまたは誘導性プロモーターに作動可能に連結することが好ましい。「作動可能に連結する」とは、プロモーターと遺伝子とが、そのプロモーターによって遺伝子の発現が調節されるように連結されることをいう。誘導性プロモーターを用いる場合、培養を、誘導条件下で行うことが好ましい。種々の誘導性プロモーターは当業者に公知である。

【0226】

クローン化した遺伝子について、生産される α -グルカンホスホリラーゼが菌体外に分泌されるように、シグナルペプチドをコードする塩基配列をこの遺伝子に連結し得る。シグナルペプチドをコードする塩基配列は当業者に公知である。

【0227】

当業者は、 α -グルカンホスホリラーゼを生産するために、微生物（例えば、細菌、真菌など）の培養の条件を適切に設定し得る。微生物の培養に適切な培地、各誘導性プロモーターに適切な誘導条件などは当業者に公知である。

【0228】

適切な時間の培養後、 α -グルカンホスホリラーゼを培養物から回収する。生産された α -グルカンホスホリラーゼが菌体外へ分泌される場合、遠心分離によって菌体を除去すれば、上清中に α -グルカンホスホリラーゼが得られる。菌体内で生産された α -グルカンホスホリラーゼが菌体外へ分泌されない場合、超音波処理、機械的破碎、化学的破碎などの処理によって微生物を破碎し、菌体破碎液を得る。

【0229】

本発明の方法では、菌体破碎液を精製せずに用いてもよい。次いで、菌体破碎液を遠心分離して菌体の破片を除去し、上清を入手し得る。得られたこれらの上清から、本発明の酵素を、硫酸アンモニウム沈澱またはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって回収し得る。回収された生成物は、必要に応じて精製され得る。

【0230】

好ましい実施態様では、 α -グルカンホスホリラーゼは、精製段階の任意の段階で加熱され得る。この加熱工程における溶液の温度は、この溶液を30分間加熱した場合に、加熱前のこの溶液に含まれる α -グルカンホスホリラーゼの活性の50%以上、より好ましくは80%以上の活性が残る温度であることが好ましい。この温度は好ましくは約50℃～約70℃であり、より好ましくは約55℃～約65℃である。例えば、耐熱化された馬鈴薯由来タイプL α -グルカンホスホリラーゼの場合、この温度は約50℃～約60℃であることが好ましい。加熱が行われる場合、加熱時間は、反応温度を考慮して、 α -グ

ルカンホスホリラーゼの活性を大きく損なうことがない限り、任意の時間で設定され得る。加熱時間は、代表的には約10分間～約90分間、より好ましくは約30分間～約60分間である。

【0231】

反応開始時の溶液に含まれる α -グルカンホスホリラーゼの量は、反応開始時の溶液中のスクロースに対して、代表的には約0.05～1,000U/gスクロース、好ましくは約0.1～500U/gスクロース、より好ましくは約0.5～100U/gスクロースである。 α -グルカンホスホリラーゼの重量が多すぎると、反応中に変性した酵素が凝集しやすくなる場合がある。使用量が少なすぎると、 α -グルカンの収率が低下する場合がある。

【0232】

スクロースは、 $C_{12}H_{22}O_{11}$ で示される、分子量約342の二糖である。スクロースは、光合成能を有するあらゆる植物中に存在する。スクロースは、植物から単離されてもよいし、化学的に合成されてもよい。コストの面からみて、スクロースを植物から単離することが好ましい。スクロースを多量に含む植物の例としては、サトウキビ、サトウダイコンなどが挙げられる。サトウキビは、汁液中に約20%のスクロースを含む。サトウダイコンは、汁液中に約10～15%のスクロースを含む。スクロースは、スクロースを含む植物の汁液から精製糖に至るいずれの精製段階のものとして提供されてもよい。

【0233】

本発明の製造方法に用いられる耐熱化スクロースホスホリラーゼおよび α -グルカンホスホリラーゼはそれぞれ、精製酵素または粗酵素を問わず、固定化されたものでも反応に使用し得、反応の形式は、バッチ式でも連続式でもよい。固定化の方法としては、担体結合法、(例えば、共有結合法、イオン結合法、あるいは物理的吸着法)、架橋法あるいは包括法(格子型あるいはマイクロカプセル型)が使用され得る。

【0234】

プライマーの例としては、マルトオリゴ糖、アミロース、アミロペクチン、グリコーゲン、デキストリン、プルラン、カップリングシュガー、澱粉およびこれらの誘導体が挙げられる。

【0235】

本明細書中において、無機リン酸とは、SPの反応においてリン酸基質を供与し得る物質をいう。ここでリン酸基質とは、グルコース-1-リン酸のリン酸部分(moiety)の原料となる物質をいう。スクロースホスホリラーゼによって触媒されるスクロース加リン酸分解において、無機リン酸はリン酸イオンの形態で基質として作用していると考えられる。当該分野ではこの基質を慣習的に無機リン酸というので、本明細書中でも、この基質を無機リン酸という。無機リン酸には、リン酸およびリン酸の無機塩が含まれる。通常、無機リン酸は、アルカリ金属イオンなどの陽イオンを含む水中で使用される。この場合、リン酸とリン酸塩とリン酸イオンとは平衡状態になるので、リン酸とリン酸塩とは区別をしにくい。従って、便宜上、リン酸とリン酸塩とを合わせて無機リン酸という。本発明において、無機リン酸は好ましくは、リン酸の任意の金属塩であり、より好ましくはリン酸のアルカリ金属塩である。無機リン酸の好ましい具体例としては、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸三ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸三カリウム、リン酸(H_3PO_4)、リン酸二水素アンモニウム、リン酸水素二アンモニウムなどが挙げられる。

【0236】

無機リン酸は、反応開始時のSP-GP反応系において、1種類のみ含有されてもよく、複数種類含有されてもよい。

【0237】

無機リン酸は、例えば、ポリリン酸(例えば、ピロリン酸、三リン酸および四リン酸)のようなリン酸縮合体またはその塩を、物理的、化学的または酵素反応などによって分解したものを反応溶液に添加することによって提供され得る。

【0238】

本明細書において、グルコース-1-リン酸とは、グルコース-1-リン酸 ($C_6H_{13}O_9P$) およびその塩をいう。グルコース-1-リン酸は好ましくは、狭義のグルコース-1-リン酸 ($C_6H_{13}O_9P$) の任意の金属塩であり、より好ましくはグルコース-1-リン酸 ($C_6H_{13}O_9P$) の任意のアルカリ金属塩である。グルコース-1-リン酸の好ましい具体例としては、グルコース-1-リン酸二ナトリウム、グルコース-1-リン酸二カリウム、グルコース-1-リン酸 ($C_6H_{13}O_9P$)、などが挙げられる。本明細書において、括弧書きで化学式を書いていないグルコース-1-リン酸は、広義のグルコース-1-リン酸、すなわち狭義のグルコース-1-リン酸 ($C_6H_{13}O_9P$) およびその塩を示す。

【0239】

グルコース-1-リン酸は反応開始時のSP-GP反応系において、1種類のみ含有されてもよく、複数種類含有されていてもよい。

【0240】

本発明の α -グルカン製造方法において、 α -1, 6-グルコシド結合を含有する出発材料を用いる場合などの、生成物に分岐が生じる場合には、必要に応じて、枝切り酵素を用いることができる。

【0241】

本発明で用いられ得る枝切り酵素は、 α -1, 6-グルコシド結合を切断し得る酵素である。枝切り酵素は、アミロペクチンおよびグリコーゲンにともによく作用するイソアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 68) と、アミロペクチン、グリコーゲンおよびプルランに作用する α -デキストリンエンド-1, 6- α -グルコシダーゼ (プルラナーゼともいう) (EC 3. 2. 1. 41) との2つに分類される。

【0242】

枝切り酵素は、微生物、細菌、および植物に存在する。枝切り酵素を産生する微生物の例としては、*Saccharomyces cerevisiae*、*Chlamydomonas* sp. が挙げられる。枝切り酵素を産生する細菌の例としては、*Bacillus brevis*、*Bacillus acidopullulyticus*、*Bacillus macerans*、*Bacillus stearothermophilus*、*Bacillus circulans*、*Thermus aquaticus*、*Klebsiella pneumoniae*、*Thermoactinomyces thalophilus*、*Thermoanaerobacter ethanolicus*、*Pseudomonas amyloclavata*などが挙げられる。枝切り酵素を産生する植物の例としては、ジャガイモ、サツマイモ、トウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、オートムギ、サトウダイコンなどが挙げられる。枝切り酵素を産生する生物はこれらに限定されない。

【0243】

本発明の方法において、生成物に分岐を生じさせることが所望される場合には、必要に応じて、ブランチングエンザイムを用いることができる。

【0244】

本発明で用いられ得るブランチングエンザイムは、 α -1, 4-グルカン鎖の一部をこの α -1, 4-グルカン鎖のうちのあるグルコース残基の6位に転移して分枝を作り得る酵素である。ブランチングエンザイムは、1, 4- α -グルカン分枝酵素、枝つくり酵素またはQ酵素とも呼ばれる。

【0245】

ブランチングエンザイムは、微生物、動物、および植物に存在する。ブランチングエンザイムを産生する微生物の例としては、*Bacillus stearothermophilus*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus caldolyticus*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus coagulans*、*Bacil*

lus caldovelox、Bacillus thermocatenulatus、Bacillus smithii、Bacillus megaterium、Bacillus brevis、Alkalophillic Bacillus sp.、Streptomyces coelicolor、Aquifex aeolicus、Synechosystis sp.、E. coli、Agrobacterium tumefaciens、Thermus aquaticus、Rhodothermus obamensis、Neurospora crassa、酵母などが挙げられる。ブランチングエンザイムを産生する動物の例としてはヒト、ウサギ、ラット、ブタなどの哺乳類が挙げられる。ブランチングエンザイムを産生する植物の例としては、藻類、ジャガイモ、サツマイモ、ヤマイモ、キャッサバなどの芋類、ホウレンソウなどの野菜類、トウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、アワなどの穀類、えんどう豆、大豆、小豆、うずら豆などの豆類などが挙げられる。ブランチングエンザイムを産生する生物はこれらに限定されない。

【0246】

本発明の方法において、生成物に環状構造を生じさせる場合には、必要に応じて、4- α -グルカノトランスフェラーゼを用いることができる。

【0247】

本発明で用いられ得る4- α -グルカノトランスフェラーゼは、ディスプロポーショネーティングエンザイム、D-酵素、アミロマルターゼ、不均化酵素などとも呼ばれ、マルトオリゴ糖の糖転移反応（不均一化反応）を触媒し得る酵素である。4- α -グルカノトランスフェラーゼは、供与体分子の非還元末端からグルコシル基あるいは、マルトシルもしくはマルトオリゴシルユニットを受容体分子の非還元末端に転移する酵素である。従って、酵素反応は、最初に与えられたマルトオリゴ糖の重合度の不均一化をもたらす。供与体分子と受容体分子とが同一の場合は、分子内転移が生じ、その結果、環状構造をもつ生成物が得られる。

【0248】

4- α -グルカノトランスフェラーゼは、微生物および植物に存在する。4- α -グルカノトランスフェラーゼを産生する微生物の例としては、Aquifex aeolicus、Streptococcus pneumoniae、Clostridium butylicum、Deinococcus radiodurans、Haemophilus influenzae、Mycobacterium tuberculosis、Thermococcus litralis、Thermotoga maritima、Thermotoga neapolitana、Chlamydia psittaci、Pyrococcus sp.、Dictyoglomus thermophilum、Borrelia burgdorferi、Synechosystis sp.、E. coli、Thermus aquaticusなどが挙げられる。4- α -グルカノトランスフェラーゼを産生する植物の例としては、ジャガイモ、サツマイモ、ヤマイモ、キャッサバなどの芋類、トウモロコシ、イネ、コムギなどの穀類、えんどう豆、大豆などの豆類などが挙げられる。4- α -グルカノトランスフェラーゼを産生する生物はこれらに限定されない。

【0249】

本発明の方法において、生成物に環状構造を生じさせる場合には、必要に応じて、グリコーゲンデブランチングエンザイムを用いることができる。

【0250】

本発明で用いられ得るグリコーゲンデブランチングエンザイムは、 α -1, 6-グルコシダーゼ活性と、4- α -グルカノトランスフェラーゼ活性との2種類の活性をもつ酵素である。グリコーゲンデブランチングエンザイムが持つ、4- α -グルカノトランスフェラーゼ活性により、環状構造を持つ生成物が得られる。

【0251】

グリコーゲンデブランチングエンザイムは、微生物および動物に存在する。グリコーゲ

ンデブランチングエンザイムを産生する微生物の例としては、酵母などが挙げられる。グリコーゲンデブランチングエンザイムを産生する動物の例としては、ヒト、ウサギ、ラット、ブタなどの哺乳類が挙げられる。グリコーゲンデブランチングエンザイムを産生する生物はこれらに限定されない。

【0252】

本発明の製造方法に用いる溶媒は、スクロースホスホリラーゼおよび α -グルカンホスホリラーゼの酵素活性を損なわない溶媒であれば任意の溶媒であり得る。

【0253】

なお、 α -グルカンを生成する反応が進行し得る限り、溶媒が本発明の製造方法に用いる材料を完全に溶解する必要はない。例えば、酵素が固体の担体上に担持されている場合には、酵素が溶媒中に溶解する必要はない。さらに、スクロースなどの反応材料も全てが溶解している必要はなく、反応が進行し得る程度の材料の一部が溶解していればよい。

【0254】

代表的な溶媒は、水である。溶媒は、上記スクロースホスホリラーゼまたは α -グルカンホスホリラーゼを調製する際にスクロースホスホリラーゼまたは α -グルカンホスホリラーゼに付随して得られる細胞破碎液のうちの水分であってもよい。

【0255】

スクロースホスホリラーゼと、 α -グルカンホスホリラーゼと、スクロースと、プライマーと、無機リン酸またはグルコース-1-リン酸とを含む溶液中には、スクロースホスホリラーゼとスクロースとの間の相互作用および α -グルカンホスホリラーゼとプライマーとの間の相互作用を妨害しない限り、任意の他の物質を含み得る。このような物質の例としては、緩衝剤、スクロースホスホリラーゼを産生する微生物（例えば、細菌、真菌など）の成分、 α -グルカンホスホリラーゼを産生する微生物（例えば、細菌、真菌など）の成分、塩類、培地成分などが挙げられる。

【0256】

これらの材料の使用量は、公知であり、当業者によって適切に設定され得る。

【0257】

本発明の製造方法においては、まず、反応溶液を調製する。反応溶液は、例えば、適切な溶媒に、スクロースホスホリラーゼと、 α -グルカンホスホリラーゼと、固体状のスクロースと、プライマーと、無機リン酸またはグルコース-1-リン酸とを添加することにより調製され得る。あるいは、反応溶液は、スクロースホスホリラーゼ、 α -グルカンホスホリラーゼ、スクロース、プライマー、または無機リン酸もしくはグルコース-1-リン酸をそれぞれ含む溶液を混合することによって調製してもよい。あるいは、反応溶液は、スクロースホスホリラーゼと、 α -グルカンホスホリラーゼと、スクロースと、プライマーと、無機リン酸またはグルコース-1-リン酸とのうちのいくつかの成分を含む溶液に固体状の他の成分を混合することによって調製してもよい。この反応溶液には、酵素反応を阻害しない限り、必要に応じて、pHを調整する目的で任意の緩衝剤を加えてもよい。この反応溶液には、必要に応じて枝切り酵素、ブランチングエンザイム、4- α -グルカノトランスフェラーゼおよびグリコーゲンデブランチングエンザイムからなる群より選択される酵素を添加してもよい。

【0258】

次いで、反応溶液を、当該分野で公知の方法によって必要に応じて加熱することにより、反応させる。反応温度は、本発明の効果が得られる限り、任意の温度であり得る。反応開始時の反応溶液中のスクロース濃度が約5～約100%である場合には、反応温度は代表的には、約40℃～約70℃の温度であり得る。この反応工程における溶液の温度は、所定の反応時間後に反応前のこの溶液に含まれるスクロースホスホリラーゼおよび α -グルカンホスホリラーゼの少なくとも一方、好ましくは両方の活性の約50%以上、より好ましくは約80%以上の活性が残る温度であることが好ましい。この温度は好ましくは約50℃～約70℃であり、より好ましくは約55℃～約70℃、さらにより好ましくは約55℃～約65℃である。

【0259】

反応時間は、反応温度、反応により生産される α -グルカンの分子量および酵素の残存活性を考慮して、任意の時間で設定され得る。反応時間は、代表的には約1時間～約100時間、より好ましくは約1時間～約72時間、さらにより好ましくは約2時間～約36時間、最も好ましくは約2時間～約24時間である。

【0260】

このようにして、 α -グルカンを含む溶液が生産される。

【0261】

本発明の耐熱化SPとしては、実施例4と同じ条件下で用いて55℃で反応を行った場合、天然のSPよりもアミロースの収率が高いものが好ましい。この場合のアミロースの収率は、5%以上であることが好ましく、10%以上であることがより好ましく、20%以上であることがさらに好ましく、30%以上であることが最も好ましい。このような条件を満たす耐熱化SPは、実施例4と同じ条件下で反応を行い、アミロースの収率を決定することによって選択され得る。

【0262】

(5. 本発明の酵素を用いたグルコース-1-リン酸の合成方法)

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、グルコース-1-リン酸の合成方法においても有利に用いられ得る。本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを用いるグルコース-1-リン酸の合成方法は、当該分野で公知の任意のグルコース-1-リン酸の合成方法であり得る。

【0263】

本発明のグルコース-1-リン酸の合成方法は、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼ、スクロースおよび無機リン酸を含む反応溶液を反応させて、グルコース-1-リン酸を生産する工程を包含する。

【0264】

本発明のグルコース-1-リン酸の合成方法において用いられるスクロースおよび無機リン酸の定義は、上記4と同様である。

【0265】

グルコース-1-リン酸の合成方法に用いられる材料の使用量は、公知であり、当業者によって適切に設定され得る。

【0266】

本発明のグルコース-1-リン酸の合成方法においては、まず、反応溶液を調製する。反応溶液は、例えば、適切な溶媒に、スクロースホスホリラーゼと、スクロースと、無機リン酸とを添加することにより調製され得る。あるいは、反応溶液は、スクロースホスホリラーゼ、スクロース、または無機リン酸をそれぞれ含む溶液を混合することによって調製してもよい。あるいは、反応溶液は、スクロースホスホリラーゼと、スクロースと、無機リン酸とのうちのいくつかの成分を含む溶液に固体状の他の成分を混合することによって調製してもよい。この反応溶液には、酵素反応を阻害しない限り、必要に応じて、pHを調整する目的で任意の緩衝剤を加えてもよい。

【0267】

次いで、反応溶液を、当該分野で公知の方法によって必要に応じて加熱することにより、反応させる。反応温度は、本発明の効果が得られる限り、任意の温度であり得る。この反応工程における溶液の温度は、所定の反応時間後に反応前のこの溶液に含まれるスクロースホスホリラーゼ活性の約50%以上、より好ましくは80%以上の活性が残る温度であることが好ましい。この温度は好ましくは約50℃～70℃であり、より好ましくは約55℃～70℃であり、さらにより好ましくは約55℃～65℃である。

【0268】

反応時間は、反応温度および酵素の残存活性を考慮して、任意の時間で設定され得る。反応時間は、代表的には約1時間～約100時間、より好ましくは約1時間～約72時間、さらにより好ましくは約2時間～約36時間、最も好ましくは約2時間～約24時間で

ある。

【0269】

このようにして、グルコース-1-リン酸を含有する溶液が生産される。

【0270】

本発明の耐熱化SPとしては、実施例5と同じ条件下で用いて55℃で反応を行った場合、天然のSPよりもグルコース-1-リン酸の収率が高いものが好ましい。この場合のグルコース-1-リン酸の収率は、5%以上であることが好ましく、10%以上であることがより好ましく、20%以上であることがさらに好ましく、30%以上であることがさらに好ましく、40%以上であることがさらに好ましく、50%以上であることがさらに好ましく、60%以上であることがさらに好ましく、70%以上であることが特に好ましく、80%以上であることが最も好ましい。このような条件を満たす耐熱化SPは、実施例5と同じ条件下で反応を行い、グルコース-1-リン酸の収率を決定することによって選択され得る。

【0271】

(6. 本発明の酵素を用いたその他の製造方法)

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼは、上記の製造方法以外にも、スクロースホスホリラーゼを使用する、当該分野で公知の任意の製造方法において使用され得る。このような方法は、例えば、グルコース重合体の合成方法である。この方法は、本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼと、 α -グルコース-1-リン酸を基質とする第二のホスホリラーゼと、スクロースと、プライマーと、無機リン酸またはグルコース-1-リン酸とを含む反応液を反応させて、グルコース重合体を生産する工程を包含する。本明細書中では、「グルコース重合体」とは、重合体の一部にグルコース残基を含むものをいう。グルコース重合体の例としては、グルカン（例えば、 α -グルカンおよび β -1, 3-グルカン）、セロビオース、セロオリゴ糖、ラミナリビオース、ラミナリオリゴ糖およびトレハロースが挙げられる。グルコース重合体が α -グルカンの場合は、上記「4. 本発明の酵素を用いた α -グルカンの製造方法」に記載の通りである。

【0272】

α -グルカン以外のグルコース重合体の製造方法の例としては、以下が挙げられる：例えば、セロビオースホスホリラーゼおよびセロデキストリンホスホリラーゼと組み合わせた、セロビオースおよびセロオリゴ糖の製造（特許第2815023号公報「セロビオースの製造方法」を参照のこと）；ラミナリビオースホスホリラーゼおよびラミナリデキストリンホスホリラーゼと組み合わせた、ラミナリビオースおよびラミナリオリゴ糖の製造（特開平第6-343484号公報「ラミナリオリゴ糖の製造方法」を参照のこと）； β -1, 3-グルカンホスホリラーゼと組み合わせた、 β -1, 3-グルカンの製造（特開平第6-343484号公報「ラミナリオリゴ糖の製造方法」を参照のこと）；トレハロースホスホリラーゼと組み合わせたトレハロースの製造（特開平7-327691「トレハロースの製造方法」を参照のこと）などに使用され得る。これらの製造方法に本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを利用することは当業者に容易に行われ得る。このような方法に本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを用いると、従来より高温で反応を行うことができ、生成物の収率が向上する。

【0273】

(7. 本発明の製造方法によって得られた α -グルカンの用途)

本発明の製造方法によって得られた α -グルカンは、グルカンについて当該分野で公知の用途に使用され得る。 α -グルカンのなかでも特に、不溶性のアミロースには、食物繊維と同様の働きが予想され、健康食品への利用も期待できる。さらに、アミロースは、例えばヨウ素、脂肪酸などを分子内に包接し得る特徴を持つことから、医薬品、化粧品、サニタリー製品分野での用途が期待される。アミロースはまた、アミロースと同様の包接能力を持つシクロデキストリンおよびシクロアミロースの製造用原料に利用できる。さらに、アミロースを含有したフィルムは、汎用プラスチックに劣らない引張強度を持ち、生分解性プラスチックの素材として非常に有望である。高分子量のアミロースはまた、キラル

分画に適している。このようにアミロースには、多くの用途が期待されている。

【0274】

(8. 本発明の合成方法によって得られたグルコース-1-リン酸の用途)

本発明の合成方法によって得られたグルコース-1-リン酸は、グルコース-1-リン酸について当該分野で公知の用途に使用され得る。グルコース-1-リン酸は、例えば、医療用抗菌剤、抗腫瘍剤（白金錯体）、心臓病の治療薬（アミン塩）、グルカン（例えば、 α -1, 4-グルカンまたは β -1, 3-グルカン）合成の基質、セロビオース合成の基質、セロオリゴ糖合成の基質、ラミナリビオース合成の基質、ラミナリオリゴ糖合成の基質、トレハロース合成の基質として利用されている。

【0275】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0276】

(1. 測定方法および計算方法)

本発明における各種物質を、以下の測定方法によって測定した。

【0277】

(1. 1 グルコースの定量)

グルコースを、市販されている測定キットを用いて定量した。グルコースAR-I I 発色試薬（和光純薬社製）を用いて測定する。

【0278】

(1. 2 フルクトースの定量)

フルクトースを、市販されている測定キットを用いて定量した。F-キット D-グルコース/D-フルクトース（ロシュ社製）を用いて測定する。

【0279】

(1. 3 グルコース-1-リン酸の定量)

グルコース-1-リン酸を、以下の方法により定量した。300 μ l の測定試薬（20 mM Tris-HCl (pH 7.0)、3 mM NADP、15 mM 塩化マグネシウム、3 mM EDTA、15 μ M グルコース-1, 6-二リン酸、6 μ g/ml ホスホグルコムターゼ、6 μ g/ml グルコース-6-リン酸脱水素酵素）に、適切に希釈したグルコース-1-リン酸を含む溶液600 μ l を加えて攪拌し、得られた反応混合物を30℃で30分間反応させる。その後、分光光度計を用いて340 nmでの吸光度を測定する。濃度既知のグルコース-1-リン酸ナトリウムを用いて同様に吸光度を測定し、標準曲線を作成する。この標準曲線に試料で得られた吸光度を当てはめ、試料中のグルコース-1-リン酸濃度を求める。この定量法では、グルコース-1-リン酸のみが定量され、無機リン酸の量は定量されない。

【0280】

(1. 4 無機リン酸の定量)

無機リン酸を、リン酸イオンとして以下の方法により求めた。無機リン酸を含む溶液（200 μ l）に対し、800 μ l のモリブデン試薬（15 mM モリブデン酸アンモニウム、100 mM 酢酸亜鉛）を混合し、続いて200 μ l の568 mM アスコルビン酸（pH 5.0）を加えて攪拌し、得られた反応混合物を30℃で30分間反応させる。その後、分光光度計を用いて850 nmでの吸光度を測定する。濃度既知の無機リン酸を用いて同様に吸光度を測定し、標準曲線を作成する。この標準曲線に試料で得られた吸光度を当てはめ、試料中の無機リン酸を求める。この定量法では、無機リン酸の量が定量され、グルコース-1-リン酸の量は定量されない。

【0281】

(1. 5 グルカンの収量の計算方法)

SP-GP法によりグルカンを合成した場合、出発物質として無機リン酸を用いて製造

したグルカン（例えば、アミロース）の収量は、反応終了後の溶液中の、グルコース、フルクトース、およびグルコース-1-リン酸の量から、以下の式により求められる。

【0282】

【化2】

グルカン (mM グルコース当量)

= (フルクトース (mM)) - (グルコース-1-リン酸 (mM)) - (グルコース (mM))

この式は、以下の原理に基づく。

【0283】

本発明の方法では、まず、以下の式の反応 (A) が起き得る。

【0284】

【化3】

(A) スクロース+無機リン酸→グルコース-1-リン酸 + フルクトース

この反応は、スクロースホスホリラーゼにより触媒される。この反応では、スクロースと無機リン酸とが反応して、同じモル量のグルコース-1-リン酸とフルクトースとが生じる。生じたフルクトースはそれ以上他の物質と反応しないので、フルクトースのモル量を測定することによって生じたグルコース-1-リン酸のモル量がわかる。

【0285】

スクロースホスホリラーゼは、上記の反応 (A) の他に、以下の反応 (B) のスクロースの加水分解も副反応として触媒し得る。

【0286】

【化4】

(B) スクロース → グルコース + フルクトース

グルカンに取り込まれたグルコース量は以下によって計算される。

【0287】

【化5】

グルカンに取り込まれたグルコース量

= (反応Aにより生成されたグルコース-1-リン酸量) - (未反応のグルコース-1-リン酸量)

= (反応Aにより生成されたフルクトース量) - (未反応のグルコース-1-リン酸量)

反応 (B) で生成するフルクトースを考慮すると、反応Aにより生成されたフルクトースの量は、以下によって算出される：

【0288】

【化6】

(反応Aにより生成されたフルクトースの量)

= (反応終了後のフルクトース量) - (反応終了後のグルコース量)

したがって、グルカンの収量は、以下の式により求められる。

【0289】

【化7】

(グルカン (mM グルコース当量))

= (フルクトース (mM)) - (グルコース-1-リン酸 (mM)) - (グルコース (mM))

出発物質として、グルコース-1-リン酸を用いて製造したグルカンの収量は、初発のグルコース-1-リン酸の量、ならびに反応終了後の溶液中のグルコース、フルクトースおよびグルコース-1-リン酸の量から、以下の式により求められる。

【0290】

【化8】

(グルカン (mMグルコース当量))

= (初発のグルコース-1-リン酸 (mM)) + (フルクトース (mM))

- (グルコース (mM)) - (反応後のグルコース-1-リン酸 (mM))

この式は以下の原理に基づく。

【0291】

【0292】

【0293】

【0294】

【0295】

【0296】

【0297】

【0298】

出証特 2004-3099148

ウ素)を加え、660nmの吸光度を測定する。1分間に660nmの吸光度を10%低下させる酵素量を1単位とした。

【0299】

(2. 酵素の調製方法)

本発明の実施例で用いた各種酵素を、以下の方法によって調製した。

【0300】

(2. 1 スクロースホスホリラーゼの調製)

目的のスクロースホスホリラーゼ遺伝子を、選択マーカー遺伝子Amp^rおよびTet^rとともにpKK388-1に組み込み、プラスミドpKK388-SMSPを得た。このプラスミドでは、スクロースホスホリラーゼ遺伝子を、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)誘導性プロモーターの制御下に作動可能に連結した。このプラスミドを、大腸菌TG-1(STRATAGENE社製)に、コンピテントセル法により導入した。この大腸菌を、抗生物質アンピシリンを含むLB培地(1%トリプトン、0.5%イーストエキス、1%NaCl、50μg/mlアンピシリン、1.5%寒天)プレートにプレティングして、37℃で一晩培養した。このプレート上で増殖した大腸菌を選択することにより、スクロースホスホリラーゼ遺伝子が導入された大腸菌を得た。得られた大腸菌がスクロースホスホリラーゼ遺伝子を含むことを、導入された遺伝子の配列を解析することによって確認した。また、得られた大腸菌がスクロースホスホリラーゼを発現していることを、活性測定によって確認した。

【0301】

得られた大腸菌を、LB液体培地(1%トリプトン、0.5%イーストエキス、1%NaCl、50μg/mlアンピシリン)5mlで18時間培養し、全量を別のLB液体培地1Lに植菌し、120rpmで振盪させながら37℃で6~7時間振盪培養した。その後、IPTGを0.04mMになるようにこの培地に添加し、30℃でさらに18時間振盪培養することによってスクロースホスホリラーゼを発現させた後、培養液を5,000rpmにて5分間遠心分離して、大腸菌の菌体を収集した。得られた菌体を、50mlの20mM Tris-塩酸緩衝液(pH7.0)中に懸濁し、次いで超音波処理により破碎し、菌体破碎液50mlを得た。次いで、菌体破碎液にスクロースを加えて、20%スクロースを含む菌体破碎液を得た。この菌体破碎液を、55℃の水浴中で20分間加熱した。加熱後、遠心機(ベックマン社製、AVANTI J-25I)を用いて8,500rpmにて20分間遠心分離し、不溶性のタンパク質などを除去し、上清を得た。

【0302】

得られた上清を、あらかじめ平衡化しておいた陰イオン交換樹脂Q-Sepharose(アマシャムファルマシア社製)に流してスクロースホスホリラーゼを樹脂に吸着させた。樹脂を、100mM塩化ナトリウムを含む緩衝液で洗浄して不純物を除去した。続いて、300mM塩化ナトリウムを含む緩衝液でスクロースホスホリラーゼを溶出させ、耐熱化スクロースホスホリラーゼ酵素液とした。次いで、あらかじめ平衡化したPhenyl-TOYOPEARL樹脂(東ソー社製)に、1.5M硫酸アンモニウムを含む上記の耐熱化スクロースホスホリラーゼ酵素液を流して吸着させた。樹脂を、1.05M硫酸アンモニウムを含む緩衝液で洗浄し不純物を除去した。続いて、0.75M硫酸アンモニウムを含む緩衝液でスクロースホスホリラーゼを溶出し、精製スクロースホスホリラーゼを得た。この段階で本発明に使用し得るグルカンホスホリラーゼ含有溶液になるが、さらなる精製を必要とする場合は、Sephacryl S-200HR(アマシャムファルマシア社製)などを用いたゲルフィルトレーションクロマトグラフィーによる分画を行なうことで精製酵素液が得られる。

【0303】

得られた精製スクロースホスホリラーゼ酵素液約1μgを用いてSDS-PAGE(SDS-ポリアクリルアミド電気泳動)を行った。その結果、どの精製スクロースホスホリラーゼ酵素液についても、分子量約55,000のところに単一のバンドが認められ、他の場所にはバンドが見られなかった。このようにして、スクロースホスホリラーゼが均質

に精製されたことが示された。

【0304】

(2.2 組換え *Thermus aquaticus* α -グルカンホスホリラーゼの調製方法)

Thermus aquaticus α -グルカンホスホリラーゼ遺伝子 (J. Appl. Glycosci., 48 (1) (2001) 71) を、選択マーカー遺伝子 *Amp^r* および *Tet^r* とともに pKK388-1 (CLONTECH社製) に組み込み、プラスミド pKK388-GP を得た。このプラスミドでは、 α -グルカンホスホリラーゼ遺伝子を、イソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 誘導性プロモーターの制御下に作動可能に連結した。このプラスミドを、大腸菌 MC1061 (ファルマシア社製) に、コンピテントセル法により導入した。この大腸菌を、抗生物質アンピシリンを含む LB 培地 (1% トリプトン、0.5% イーストエキス、1% NaCl、50 μ g/ml アンピシリン、1.5% 寒天) プレートにプレーティングして、37℃ で一晩培養した。このプレート上で増殖した大腸菌を選択することにより、 α -グルカンホスホリラーゼ遺伝子が導入された大腸菌を得た。得られた大腸菌が α -グルカンホスホリラーゼ遺伝子を含むことを、導入された遺伝子の配列を解析することによって確認した。また、得られた大腸菌が α -グルカンホスホリラーゼを発現していることを、活性測定によって確認した。

【0305】

得られた大腸菌を、LB 液体培地 (1% トリプトン、0.5% イーストエキス、1% NaCl、50 μ g/ml アンピシリン) 5ml で 18 時間培養し、全量を別の LB 液体培地 1L に植菌し、1200 rpm で振盪させながら 37℃ で 4~5 時間振盪培養した。その後、IPTG を 0.01 mM になるようにこの培地に添加し、37℃ でさらに 20 時間振盪培養した。次いで、この培養液を 5,000 rpm にて 5 分間遠心分離して、大腸菌の菌体を収集した。得られた菌体を、50ml の 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 中に懸濁し、次いで超音波処理により破碎し、菌体破碎液 50ml を得た。

【0306】

次いで、菌体破碎液を 70℃ で 30 分間加熱した。加熱後、この菌体破碎液を 8,500 rpm で 20 分間遠心分離し、不溶性のタンパク質などを除去し、上清を得た。得られた上清を、組換え *Thermus aquaticus* α -グルカンホスホリラーゼ溶液とした。

【0307】

(実施例 1: 耐熱化スクロースホスホリラーゼ遺伝子の作製、スクリーニングおよび配列決定)

概略を述べると、*Streptococcus mutans* 由来のスクロースホスホリラーゼ遺伝子にランダム変異を導入し、ランダム変異の導入された遺伝子が大腸菌に導入して、ランダム変異の導入されたスクロースホスホリラーゼを発現させ、発現されたスクロースホスホリラーゼのうち、52.5℃ で 15 分間加熱した後、グルカンを合成する能力を有する耐熱化スクロースホスホリラーゼを発現する大腸菌を選択し、この大腸菌から耐熱化スクロースホスホリラーゼ遺伝子を単離してその配列を決定した。

【0308】

詳細には、以下の通りである。

【0309】

まず、配列番号 1 に示す天然の *Streptococcus mutans* 由来スクロースホスホリラーゼ遺伝子に対して、当業者に公知のエラープロン PCR 法によりランダム変異を導入して、ランダム変異の導入された SP 遺伝子を得た。この条件では一般に、スクロースホスホリラーゼ遺伝子 1 つにつき、1~2 箇所のランダム変異が入る。ランダム変異の導入された SP 遺伝子を選択マーカー遺伝子 *Amp^r* および *Tet^r* とともに pKK388-1 に組み込み、プラスミドライブラリー pKK388-SMSP を得た。このプラスミドライブラリーでは、スクロースホスホリラーゼ遺伝子を、イソプロピルー

β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 誘導性プロモーターの制御下に作動可能に連結した。

【0310】

このプラスミドライブラリーを、大腸菌TG-1に、コンピテントセル法により導入した。この大腸菌を、抗生物質アンピシリンを含むLB培地 (1%トリプトン、0.5%イーストエキス、1%NaCl、50 μ g/mlアンピシリン、1.5%寒天) プレートにプレーティングして、37℃で一晩培養した。このプレート上で増殖した大腸菌を選択することにより、スクロースホスホリラーゼ遺伝子が導入された複数 (約10万個) の大腸菌を得た。

【0311】

この大腸菌の各々を別々の50 μ g/mlアンピシリンを含むTERRIFICBROTH液体培地 (GIBCO BRL社製) 150 μ lに接種し、37℃で18時間静置培養した。その後、この培養液に溶菌液 (10mg/ml卵白リゾチーム、1U/mlデオキシリボヌクレアーゼ、200mM塩化マグネシウム、0.5%トライトンX-100) 150 μ lを加えた後、-80℃で1時間凍結し、37℃で1時間溶解させ、菌体抽出液を得た。得られた菌体抽出液を、遠心機 (日立社製、CT-13R) を用いて13,000rpmにて10分間遠心分離し、不溶性のタンパク質などを除去し、上清を得た。

【0312】

得られた上清50 μ lを1.5mlのマイクロチューブに入れ、52.5℃で15分間加熱した後、速やかに氷上に移し加熱を停止した。次いで、50 μ lのアッセイ溶液 (4%スクロース、100mMリン酸バッファー (pH7.0)、0.5mMマルトテトラオース、2U/ml馬鈴薯由来 α -グルカンホスホリラーゼ) を加え混合した後、45℃で2時間インキュベートした。その後、100 μ lのヨウ素液 (1.3%ヨウ化カリウム、0.13%ヨウ素) を加え発色させた。上清中にスクロースホスホリラーゼが存在すると、インキュベートの際にスクロースからアミロースが合成され、アミロースはヨウ素によって青色に発色するがスクロースは発色しないので、ヨウ素液で青色に呈色したものは、耐熱化スクロースホスホリラーゼを含むものである。上記の方法によりスクリーニングして、ランダム変異を有するスクロースホスホリラーゼ遺伝子を含む形質転換大腸菌 (約8万個) から、耐熱化スクロースホスホリラーゼ遺伝子を含む大腸菌 (約100個) を得た。

【0313】

上記スクリーニングにより得られた、耐熱化スクロースホスホリラーゼ遺伝子を含む大腸菌から当該分野で公知の方法に従ってプラスミドを回収し、DNAシーケンサー (ABI社製) を用いてこのプラスミド中の耐熱化スクロースホスホリラーゼ遺伝子の配列を決定した。

【0314】

この耐熱化スクロースホスホリラーゼ遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を、天然のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列 (配列番号2のアミノ酸配列) と比較したところ、天然のスクロースホスホリラーゼの47、62、77、128、140、144、155、および249番目にあたるアミノ酸の位置に変異が導入されており、それぞれT47→S、S62→P、Y77→H、V128→L、K140→M、Q144→R、N155→S、およびD249→Gにアミノ酸置換されていた。このように、スクロースホスホリラーゼの耐熱性向上に効果のあると思われるアミノ酸位置が8種類確認された。この中でも特に、T47→SおよびV128→Lの変異は、いわゆる保存的置換である。保存的置換と言われるような類似のアミノ酸に置換した場合でさえも耐熱化が見られることから、この位置が耐熱性に特に関係のある位置であることが推測され、そしてさらに、類似していない他のアミノ酸に置換した場合にさらなる耐熱化が見られるのではないかと期待される。また、これらの8箇所以外には耐熱性に影響のある変異が見られなかったので、他の位置の変異は、耐熱性に効果がないと考えられる。

【0315】

また、T47においてS以外のアミノ酸、S62においてP以外のアミノ酸、Y77においてH以外のアミノ酸、V128においてL以外のアミノ酸、K140においてM以外のアミノ酸、Q144においてR以外のアミノ酸、N155においてS以外のアミノ酸、またはD249においてG以外のアミノ酸についても耐熱化が見られる。

【0316】

(実施例2: 部位特異的変異誘発による耐熱化スクロースホスホリラーゼの作製、および耐熱性の測定)

(1) 部位特異的変異誘発による耐熱化スクロースホスホリラーゼの作製

概略を述べると、上記の8種類の変異を組み合わせたライブラリーを作製した。そのライブラリーをスクリーニングし、耐熱性がさらに向上したスクロースホスホリラーゼを得た。

【0317】

詳細には、実施例1と同様にして耐熱化スクロースホスホリラーゼの発現ベクターを作製した。本実施例では、実施例1で耐熱化に寄与することが判明した位置の置換を1つのみ有する耐熱化SPをコードする遺伝子と、いずれか2つ～7つの組み合わせで有する耐熱化SPをコードする遺伝子と、8つ全てを有する耐熱化SPをコードする遺伝子とを作製した。例として、8つすべての変異(T47S、S62P、Y77H、V128L、K140K、Q144R、N155S、およびD249G)を有する耐熱化SPをコードする塩基配列を配列番号21に、そしてこの耐熱化SPのアミノ酸配列を配列番号22に示す。これらのアミノ酸置換は、当該分野で公知の部位特異的変異誘発法を使用して行われた。

【0318】

このようにして得られた耐熱化SPをコードする遺伝子をそれぞれ用いて、上記実施例1と同様にpKK388-1に組み込み、プラスミドpKK388-SPMSを作製した。このプラスミドを、大腸菌TG-1に、コンピテントセル法により導入し、この大腸菌を、抗生物質アンピシリンを含むLB培地(1%トリプトン、0.5%イーストエキス、1%NaCl、50 μ g/mlアンピシリン、1.5%寒天)プレートにプレATINGして、37℃で一晩培養した。このプレート上で増殖した大腸菌を選択することにより、耐熱化スクロースホスホリラーゼ遺伝子が導入された大腸菌を得た。得られた大腸菌がスクロースホスホリラーゼ遺伝子を含むことを、導入された遺伝子の配列を解析することによって確認した。このようにして、耐熱化SPを発現する大腸菌が作製できた。

【0319】

得られた耐熱化スクロースホスホリラーゼを発現する大腸菌から、2.1に記載の方法により耐熱化スクロースホスホリラーゼ酵素液を調製した。

【0320】

(1-2) 天然のスクロースホスホリラーゼの調製

配列番号1の遺伝子を用いて、2.1に記載の方法に従って、天然のスクロースホスホリラーゼ酵素液を調製した。

【0321】

(1-3) 天然のスクロースホスホリラーゼのC末端に置換および付加を有するスクロースホスホリラーゼ(No. 33)の調製

配列番号2のスクロースホスホリラーゼと比較して、C末端の2アミノ酸FEをSLに置換し、さらにメチオニン、イソロイシン、セリン、システイン、グルタミンおよびトレオニンをこの順序で付加したスクロースホスホリラーゼ(便宜的にNo. 33と示す)酵素液を、配列番号23の遺伝子を用いて、2.1に記載の方法に従って調製した。

【0322】

(1-4) 変異型SPのC末端に置換および付加を有するスクロースホスホリラーゼ(No. 1a、2a、3a、4a、5aおよび6a)の調製

目的の変異を有する耐熱化SP酵素のC末端にアミノ酸の置換および付加を行ない、これらの置換および付加は耐熱性への影響がないことを確認した。

【0323】

詳しくは、2. 1に示した方法と同様にして、表4のNo. 1、2、3、4、5または6の各々の耐熱化SP酵素のC末端の2アミノ酸（フェニルアラニン、グルタミン酸）を、それぞれロイシン、セリンに置換し、さらに6アミノ酸を、メチオニン、イソロイシン、セリン、システイン、グルタミン、トレオニンの順に付加したC未改変SP酵素液を調製し、耐熱性を測定した。

【0324】

(2) 種々のスクロースホスホリラーゼの耐熱性の測定

上記(1)～(1-4)で調製された耐熱化SP酵素液または他のSP酵素液の耐熱性を測定した。測定を、以下の通りに行った。

【0325】

(i) スクロースの非存在下でのSPの耐熱性

まず、各SP酵素液を37℃で2.5～3.5U/mlになるように20mM Tris緩衝液(pH7.0)によって適切に希釈した。希釈した酵素液50μlを55℃で20分間、または、57℃で20分間、または60℃で20分間加熱した。加熱終了後直ちに氷上で10分間保持して冷却した。冷却後の酵素液の活性および加熱前の酵素液の活性を、1.7に記載のSP活性測定法に従って37℃で測定した。各酵素の耐熱性を、加熱前のスクロースホスホリラーゼの酵素活性に対する、加熱後のスクロースホスホリラーゼの酵素活性の割合(残存活性)を求めることにより測定した。

【0326】

(ii) スクロースの存在下でのSPの耐熱性

まず、各SP酵素液を5.0～7.0U/mlになるように20mM Tris緩衝液(pH7.0)によって適切に希釈した。希釈した酵素液25μlと、40%スクロース含有20mM Tris緩衝液(pH7.0)25μlとを混合した。この混合溶液50μlを65℃で20分間加熱した。加熱終了後直ちに氷上で10分間保持して冷却した。冷却後の酵素液の活性および加熱前の酵素液の活性を、1.7に記載のSP活性測定法に従って37℃で測定した。各酵素の耐熱性を、加熱前のスクロースホスホリラーゼの酵素活性に対する、加熱後のスクロースホスホリラーゼの酵素活性の割合(残存活性)を求めることにより測定した。スクロースの非存在下で55℃、57℃または60℃で加熱した場合、ならびにスクロースの存在下で65℃で加熱した場合の結果を以下の表4に示す。表4には、それぞれの変異体がどの変異を有するかについても示す。

【0327】

【表4】

	55℃	57℃	60℃	65℃	T47S	S62P	Y77H	V128L	K140M	Q144R	N155S	D249G	C末端 改変
No.	-Suc	-Suc	-Suc	+Suc									
1	99.3	98.3	80.6	99.3	○	○	○	○	○	○	○	○	-
1a	99.1	97.4	80.5	98.9	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2	99.4	95.2	67.2	99.1	○	○	○	○	-	○	○	○	-
2a	99.1	96.1	66.4	98.3	○	○	○	○	-	○	○	○	○
3	98.3	86.5	20.9	98.2	○	-	-	○	-	○	-	○	-
3a	98.7	85.1	21.3	97.4	○	-	-	○	-	○	-	○	○
4	94.2	86.5	14.8	91.7	○	○	-	-	-	○	-	○	-
4a	95.8	88.1	15.3	93.3	○	○	-	-	-	○	-	○	○
5	95.8	93.7	35.9	94.8	○	-	-	○	-	○	○	○	-
5a	94.9	94.2	37.4	92.9	○	-	-	○	-	○	○	○	○
6	98.4	99.3	38.4	95.4	○	○	-	○	-	-	○	○	-
6a	97.3	96.3	36.1	93.2	○	○	-	○	-	-	○	○	○
7	95.5	94.1	30.6	93.3	○	○	○	○	○	○	-	-	-
8	91.8	80.8	28.9	88.9	○	○	○	○	-	○	○	-	-
9	99.4	83.5	22.0	84.3	○	○	-	-	-	○	○	○	-
10	95.4	83.2	27.1	88.4	○	-	○	-	○	○	-	○	-
11	96.2	89.4	26.1	89.6	○	○	○	-	-	○	○	○	-
12	96.3	83.0	25.4	69.4	-	-	-	○	-	○	○	○	-
13	91.8	70.3	19.1	78.3	○	○	-	○	-	○	○	-	-
14	90.5	78.0	20.5	62.4	-	-	-	○	-	-	○	○	-
15	90.0	77.1	17.7	82.6	-	○	-	○	-	○	-	○	-
16	94.3	80.6	18.3	85.0	○	○	-	-	○	-	○	○	-
17	92.2	75.9	11.5	85.0	○	○	-	-	-	-	-	○	-
18	98.5	81.9	14.6	83.5	○	○	-	-	-	-	○	○	-
19	88.7	60.7	11.9	83.2	○	○	○	○	-	○	-	-	-
20	80.3	49.4	7.6	38.7	-	-	○	○	-	-	○	-	-
21	80.8	48.8	7.1	53.4	-	-	○	-	○	○	-	○	-
22	81.2	47.5	4.1	79.1	○	○	-	○	-	-	-	-	-
23	85.2	40.2	3.6	55.8	○	○	-	-	-	○	○	-	-
24	77.4	30.1	1.1	38.2	○	-	-	-	-	-	-	○	-
25	47.3	11.5	1.1	30.4	○	-	-	-	-	-	-	-	-
26	33.4	4.4	1.4	9.5	-	○	-	-	-	-	-	-	-
27	22.6	2.2	1.4	6.9	-	-	○	-	-	-	-	-	-
28	26.6	3.0	1.7	10.8	-	-	-	○	-	-	-	-	-
29	39.9	6.1	1.1	12.3	-	-	-	-	○	-	-	-	-
30	23.2	2.1	1.3	5.2	-	-	-	-	-	○	-	-	-
31	37.8	6.3	1.0	6.3	-	-	-	-	-	-	○	-	-
32	47.7	11.1	1.2	27.5	-	-	-	-	-	-	-	○	-
33	10.6	2.3	1.8	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	○
WT	11.3	2.3	1.8	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-

上記の表4において、WTとは、変異していない天然の*Streptococcus mutans*由来のスクロースホスホリラーゼを示す。No. 33の変異体は、天然の*Streptococcus mutans*由来のスクロースホスホリラーゼのC末端の2アミノ酸FEをSLに置換し、さらにメチオニン、イソロイシン、セリン、システイン、

グルタミンおよびトレオニンがこの順序で付加したスクロースホスホリラーゼを示す。○は、その位置の変異を有することを示す。例えば、No. 3の変異体は、T47S、V128L、Q144R、およびD249Gの変異を有する。なお、この表において、5%未満の活性値は、活性測定で定量されるグルコース-1-リン酸の検出限界に極めて近いいため、信頼性が極めて低く、ほぼ0であるとみなせる。

【0328】

なお、C末端の改変についての「○」は、480位のフェニルアラニンがロイシンに置換され、481位のグルタミン酸がセリンに置換され、メチオニン、イソロイシン、セリン、システイン、グルタミン、トレオニンがその先(482~487位)に付加されている。

【0329】

この結果、耐熱性に寄与する8箇所のアミノ酸残基は、1箇所置換されるだけでも、天然のSPと比較して耐熱性を向上させることがわかった。さらに、これら8箇所のアミノ酸残基のうちのいくつかまたはすべてが多重置換されることによって、スクロースホスホリラーゼの耐熱性がさらに向上することがわかった。

【0330】

一方、C末端でのアミノ酸の置換および付加は、耐熱性にほとんど影響を与えなかった。このように、本発明の効果を阻害しない程度のアミノ酸の置換もしくは付加を行ない得ること、および本発明者らが見出した位置での置換が耐熱性に関して重要であって他の位置での置換は意味がないことがわかった。

【0331】

スクロース存在下での耐熱性を測定したいずれの変異スクロースホスホリラーゼについても、スクロースが存在することによって、スクロースの非存在下と比較して耐熱性が向上した。

【0332】

(実施例3:耐熱化スクロースホスホリラーゼの高温での比活性)

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼの55℃での比活性を調べた。

【0333】

詳細には、まず、表4におけるNo. 2、3、4、5もしくは6の各々の精製耐熱化スクロースホスホリラーゼ酵素液またはコントロールの天然(WT)のStreptococcus mutansスクロースホスホリラーゼ酵素液を37℃で1U/mlになるように20mM Tris緩衝液(pH7.0)によって適切に希釈した。希釈した酵素液の活性を、反応温度が55℃であること以外は1.7に記載のSP活性測定法に従って測定した。

【0334】

一方、反応に使用した酵素液量と同じ量の酵素液中のスクロースホスホリラーゼの量を、プロテインアッセイキット(バイオラッド社製)を製造業者の指示に従って用いて測定した。測定用の検量線はIgGを用いて作成した。

【0335】

このようにして得られたSPの活性(A(U/ml))とSPの重量(W(mg/ml))とから、 $A \div W$ (U/mg)によってSPの比活性を求めた。

【0336】

結果を以下の表5に示す。

【0337】

【表5】

No.	比活性 (U/mgタンパク質)
2	44.1
3	96.4
4	163.9
5	32.2
6	40.3
WT	10.7

この結果、変異を導入することによって55℃での比活性が顕著に向上することがわかった。

【0338】

(実施例4:耐熱化スクロースホスホリラーゼを用いたアミロース合成)

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを用いたアミロース合成におけるアミロースの収率を調べた。耐熱化スクロースホスホリラーゼとして、上記実施例3で調製された各種耐熱化SP (No. 1~6、25および32)を用いた。

【0339】

対照として、天然の*Streptococcus mutans*由来スクロースホスホリラーゼを用いた。

【0340】

アミロース合成反応を、以下の表6に記載の組成の反応系を用いて、50℃または55℃で18時間行った。

【0341】

【表6】

アミロース合成反応の組成	量
スクロース	292.3mM
マルトテトラオース (G4)	1mM
無機リン酸 (Pi)	10mM
α -グルカンホスホリラーゼ	1U/ml
スクロースホスホリラーゼ	1U/ml

ここで、 α -グルカンホスホリラーゼとして、2.2で調製した組換え*Thermus aquaticus*由来グルカンホスホリラーゼを用いた。

【0342】

この反応によって合成されたアミロースの収率を上記の「1. 測定方法および計算方法」により計算した。

【0343】

この方法により合成されたアミロースの収率を、以下の表7に示す。

【0344】

【表 7】

合成されたアミロースの収率

No.	アミロース収率 (%)	
	50℃	55℃
1	91.3	35.3
2	91.9	34.1
3	90.3	30.5
4	87.4	26.3
5	88.8	24.7
6	91.1	27.7
25	61.3	7.3
32	59.5	5.4
WT	27.8	2.1

以上のように、本発明の耐熱化SPは、高温条件下（例えば、50℃～55℃）でアミロースを合成し得ることがわかった。本発明の耐熱化SPを用いると、野生型のSPを用いた場合と比較して約2倍～約18倍高い収率でアミロースを合成できることがわかった。

【0345】

（実施例5：耐熱化スクロースホスホリラーゼを用いたグルコース-1-リン酸の合成）

本発明の耐熱化スクロースホスホリラーゼを用いたグルコース-1-リン酸の合成におけるグルコース-1-リン酸の収率を調べた。耐熱化スクロースホスホリラーゼとして、上記実施例3で調製された各種耐熱化スクロースホスホリラーゼ（No. 1～6、25および32）を用いた。対照として、天然（配列番号2）の *Streptococcus mutans* 由来スクロースホスホリラーゼを用いた。グルコース-1-リン酸合成反応を以下の表8に記載の組成の反応系を用いて、50℃または55℃で18時間行なった。

【0346】

【表 8】

G-1-P 合成反応の組成	量
スクロース	300mM
無機リン酸 (Pi)	300mM
スクロースホスホリラーゼ	1U/ml

この反応によって合成されたグルコース-1-リン酸を、上記の「1. 測定方法および計算方法」に記載の方法により定量した。得られたグルコース-1-リン酸の収率を、以下の式に従って求めた。

【0347】

【数 3】

収率(%) = グルコース-1-リン酸の収量(mM) / 初発のスクロース濃度(300mM) × 100

結果を、以下の表9に示す。

【0348】

【表 9】

No.	グルコース-1-リン酸 の収率 (%)	
	50℃での反応	55℃での反応
1	88.2	88.5
2	89.3	87.2
3	87.6	89.4
4	88.1	87.3
5	85.8	80.3
6	81.1	82.2
25	78.0	19.0
32	79.9	7.8
WT	70.4	5.4

以上のように、本発明の耐熱化SPは高温条件下でグルコース-1-リン酸を合成し得ることがわかった。本発明の耐熱化SPを用いると、特に55℃の反応条件では、野生型のSPを用いた場合と比較して約1.5倍～約16倍高い収率でアミロースを合成できることがわかった。

【0349】

(実施例6：加熱処理による夾雑タンパク質の除去の確認)

加熱処理によって耐熱化スクロースホスホリラーゼの精製が容易にできることを以下の方法で確認した。

【0350】

表4で示したNo. 1、2、3、4および5の耐熱化スクロースホスホリラーゼを発現する大腸菌、およびコントロールとして天然（配列番号2）の *Streptococcus mutans* 由来スクロースホスホリラーゼを発現する大腸菌を、それぞれ実施例2の(1)に記載の方法と同様に培養した。培養液を遠心分離することにより、菌体を回収し、菌体を緩衝液に懸濁し、超音波処理することにより、菌体抽出液を得た。この菌体抽出液にスクロースを添加して20%のスクロース濃度の混合液を得て、この混合液を65℃で20分間加熱後、遠心分離することにより不溶性のタンパク質を除去し、SP酵素液を得た。このSP酵素液の37℃における比活性を求めた。結果を表10に示す。比活性の算出に用いたタンパク量の測定を、実施例3に記載した方法と同様に行なった。また、加熱前および加熱後のSP酵素液中に含まれるホスファターゼ活性およびアミラーゼ活性を測定し、加熱前と比較してどれくらいの割合のホスファターゼ活性およびアミラーゼ活性が残存しているかを決定した。その結果を表11に示す。

【0351】

【表10】

比活性

No.	加熱前 (U/mgタンパク質)	加熱後 (U/mgタンパク質)
1	11.8	37.2
2	8.5	42.2
3	9.3	33.8
4	14.1	56.8
5	8.0	27.2
6	13.9	41.1
WT	10.5	0.1

【0352】

【表11】

SP酵素液中のホスファターゼ活性およびアミラーゼ活性

No.	ホスファターゼ活性 (%)	アミラーゼ活性 (%)
1	2.6	0.6
2	2.1	0.2
3	1.7	0.4
4	2.7	0.6
5	2.5	0.2
6	1.8	0.4
WT	2.2	0.5

耐熱化SPを含む酵素液を65℃で加熱し、変性したタンパク質を除去することにより、得られる精製酵素液の比活性が、加熱前の約3倍～約5倍に向上した。これは、耐熱化SPは変性せず、夾雑タンパクの大部分が変性し除去されたことを示す。これに比べて天然(WT; 配列番号2)のSPの比活性は約100分の1に低下した。これは夾雑タンパク質だけでなくSPタンパク質も変性していることを示す。さらに、65℃で加熱することにより、宿主菌由来のホスファターゼ活性およびアミラーゼ活性を、それぞれ加熱前の約3.0%以下および約1.0%以下にまで低下させることができた。以上のように、耐熱化SPを熱処理することによって、耐熱化SPを簡便に精製できることがわかった。

【0353】

(実施例7: C末端でのアミノ酸の置換およびC末端へのアミノ酸の付加による、比活性への影響)

目的の変異以外に、SP酵素のC末端にアミノ酸の置換および付加を行ない、比活性への影響がないことを確認した。

【0354】

詳しくは、配列番号23に示す塩基配列を持つDNAを用い、2.1に示した方法と同様にして配列番号24に示すアミノ酸配列をもつC末端改変SP酵素(上記実施例2の(1-3))で作製したNo. 33)を調製し、比活性を測定した。

【0355】

このC末端改変SP酵素および天然のSP酵素の37℃における比活性を、反応温度が37℃である以外は実施例3に記載の方法に従って測定した。結果を以下の表12に示す。この結果、C末端改変SP酵素の比活性と天然のSP酵素の比活性との間に差はほとんど認められなかった。このことから、C末端でのアミノ酸の置換およびC末端へのアミノ酸の付加は、スクロースホスホリラーゼの活性に対してほとんど影響を与えないことがわかった。

【0356】

【表12】

酵素	比活性 (U/mgタンパク質)
天然SP酵素	62.5
C末端改変SP酵素 (No. 33)	60.4

【産業上の利用可能性】

【0357】

本発明により、グルカン、G-1-Pなどの高温での効率的な生産に利用され得る耐熱性のスクロースホスホリラーゼが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0358】

【図1A】 図1Aは、GENETYX-WIN Ver. 4.0のマルチプルアライ
出証特2004-3099148

メントにおいてアライメントした、いくつかの生物由来のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列を示す図である。図1Aは図1Bに続く。

【図1B】図1Aの続きである。

【図1C】図1Bの続きである。

【図2】図2は、種々の細菌（大腸菌TG-1および大腸菌BL21）を50℃、55℃、60℃または65℃で30分間加熱した後のホスファターゼの残存活性（%）を示すグラフである。

【図3】図3は、種々の細菌（大腸菌TG-1、大腸菌BL21および枯草菌ANA-1）を50℃、55℃、60℃または65℃で30分間加熱した後のアミラーゼの残存活性（%）を示すグラフである。

【配列表フリーテキスト】

【0359】

(配列表の説明)

配列番号1: *Streptococcus mutans* のスクロースホスホリラーゼの塩基配列;

配列番号2: *Streptococcus mutans* のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号3: *Streptococcus pneumoniae* のスクロースホスホリラーゼの塩基配列;

配列番号4: *Streptococcus pneumoniae* のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号5: *Streptococcus sorbinus* のスクロースホスホリラーゼの塩基配列;

配列番号6: *Streptococcus sorbinus* のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号7: *Leuconostoc mesenteroides* のスクロースホスホリラーゼの塩基配列;

配列番号8: *Leuconostoc mesenteroides* のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号9: *Oenococcus oeni* のスクロースホスホリラーゼの塩基配列;

配列番号10: *Oenococcus oeni* のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号11: *Bifidobacterium longum* のスクロースホスホリラーゼの塩基配列;

配列番号12: *Bifidobacterium longum* のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号13: *Agrobacterium vitis* のスクロースホスホリラーゼの塩基配列;

配列番号14: *Agrobacterium vitis* のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号15: *Pseudomonas saccharophila* のスクロースホスホリラーゼの塩基配列;

配列番号16: *Pseudomonas saccharophila* のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号17: *Escherichia coli* のスクロースホスホリラーゼの塩基配列;

配列番号18: *Escherichia coli* のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号19: *Listeria innocua* のスクロースホスホリラーゼの塩基

配列;

配列番号 20: *Listeria innocua* のスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号 21: 実施例 2 で作製した、8 つすべての変異 (T 4 7 S、S 6 2 P、Y 7 7 H、V 1 2 8 L、K 1 4 0 M、Q 1 4 4 R、N 1 5 5 S および D 2 4 9 G) を有する耐熱化スクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列;

配列番号 22: 実施例 2 で作製した、8 つすべての変異 (T 4 7 S、S 6 2 P、Y 7 7 H、V 1 2 8 L、K 1 4 0 M、Q 1 4 4 R、N 1 5 5 S および D 2 4 9 G) を有する耐熱化スクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列;

配列番号 23: 実施例 7 で使用した、C 末端にアミノ酸の置換および付加のあるスクロースホスホリラーゼをコードする塩基配列;

配列番号 24: 実施例 7 で使用した、C 末端にアミノ酸の置換および付加のあるスクロースホスホリラーゼのアミノ酸配列。

SEQUENCE LISTING

100	105	110	
aat tgg gat aaa ttt tgg cct aaa aat cgc ccg aca caa gaa gat gtg			384
Asn Trp Asp Lys Phe Trp Pro Lys Asn Arg Pro Thr Gln Glu Asp Val			
115	120	125	
gac ctg att tat aag cgt aag gat cga gca cct aag cag gaa atc caa			432
Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Arg Ala Pro Lys Gln Glu Ile Gln			
130	135	140	
ttt gca gat ggc agt gtt gaa cat ctc tgg aac act ttt ggg gag gaa			480
Phe Ala Asp Gly Ser Val Glu His Leu Trp Asn Thr Phe Gly Glu Glu			
145	150	155	160
cag att gat ctt gac gtg act aaa gaa gtg act atg gat ttt att cgc			528
Gln Ile Asp Leu Asp Val Thr Lys Glu Val Thr Met Asp Phe Ile Arg			
165	170	175	
tct acc att gaa aat tta gca gcc aac ggc tgt gat ctc att cgt ttg			576
Ser Thr Ile Glu Asn Leu Ala Ala Asn Gly Cys Asp Leu Ile Arg Leu			
180	185	190	
gat gcc ttt gct tat gct gtt aaa aag cta gat acg aat gat ttc ttt			624
Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Leu Asp Thr Asn Asp Phe Phe			
195	200	205	
gtt gaa cct gaa atc tgg act ctg cta gat aaa gtt cgt gat ata gct			672
Val Glu Pro Glu Ile Trp Thr Leu Leu Asp Lys Val Arg Asp Ile Ala			
210	215	220	
gct gta tcg ggt gcg gaa atc ttg ccg gaa att cat gaa cac tat act			720
Ala Val Ser Gly Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile His Glu His Tyr Thr			
225	230	235	240
att caa ttt aaa att gca gac cat gat tac tat gtt tat gat ttt gcc			768
Ile Gln Phe Lys Ile Ala Asp His Asp Tyr Tyr Val Tyr Asp Phe Ala			
245	250	255	
ctg cct atg gtg acg ctc tac agc cta tat tcg ggc aag gtt gac cgt			816
Leu Pro Met Val Thr Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Lys Val Asp Arg			
260	265	270	
ctt gcc aaa tgg ctg aaa atg agt ccg atg aaa cag ttc acc acc ctt			864
Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu			
275	280	285	
gat aca cat gac ggt att ggt gtg gtt gat gtt aag gat atc ctg act			912
Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr			
290	295	300	

gac gaa gaa att acc tat act tct aat gag ctt tat aag gtc ggt gcc Asp.Glu.Glu Ile Thr Tyr Thr Ser Asn Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala 305 310 315 320	960
aat gtc aat cgt aag tat tca act gcc gaa tat aat aac ttg gat atc Asn Val Asn Arg Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile 325 330 335	1008
tat caa att aat tca act tac tat tca gca ctt ggt gat gat gat caa Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Gln 340 345 350	1056
aaa tac ttt ttg gcc cgc ttg ata caa gct ttt gct cca ggt att cca Lys Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro 355 360 365	1104
cag gtt tat tac gtt ggc ttt tta gct ggc aag aat gat ctt gaa tta Gln Val Tyr Tyr Val Gly Phe Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Glu Leu 370 375 380	1152
ctg gaa agc act aaa gaa ggc cgc aat atc aac cgt cat tat tat agt Leu Glu Ser Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser 385 390 395 400	1200
agt gaa gaa att gct aag gaa gtg aag cgg cca gtt gtc aag gca ctt Ser Glu Glu Ile Ala Lys Glu Val Lys Arg Pro Val Val Lys Ala Leu 405 410 415	1248
tta aat ctc ttt act tac cgc aat cag tca gca gct ttt gat ttg gat Leu Asn Leu Phe Thr Tyr Arg Asn Gln Ser Ala Ala Phe Asp Leu Asp 420 425 430	1296
ggc cgt att gaa gtg gaa acg cca aat gaa gcg acc att gtc ata gaa Gly Arg Ile Glu Val Glu Thr Pro Asn Glu Ala Thr Ile Val Ile Glu 435 440 445	1344
cgt caa aat aaa gat ggc agt cat atc gca aca gca gag att aat ctc Arg Gln Asn Lys Asp Gly Ser His Ile Ala Thr Ala Glu Ile Asn Leu 450 455 460	1392
caa gat atg aca tac aga gta aca gaa aat gat caa aca ata agc ttt Gln Asp Met Thr Tyr Arg Val Thr Glu Asn Asp Gln Thr Ile Ser Phe 465 470 475 480	1440
gaa Glu	1443

<211> 481
<212> PRT
<213> Streptococcus mutans

<400> 2

Met Pro Ile Thr Asn Lys Thr Met Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Leu
1 5 10 15

Gly Lys Asn Leu Lys Glu Leu Asn Glu Asn Ile Glu Asn Tyr Phe Gly
 20 25 30

Asp Ala Val Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Thr Gly
 35 40 45

Asp Arg Gly Phe Ala Pro Ile Asp Tyr His Glu Val Asp Ser Ala Phe
 50 55 60

Gly Asp Trp Asp Asp Val Lys Arg Leu Gly Glu Lys Tyr Tyr Leu Met
65 70 75 80

Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Gln Ser Lys Tyr Tyr Lys
 85 90 95

Asp Tyr Gln Glu Lys His Glu Ala Ser Ala Tyr Lys Asp Leu Phe Leu
 100 105 110

Asn Trp Asp Lys Phe Trp Pro Lys Asn Arg Pro Thr Gln Glu Asp Val
 115 120 125

Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Arg Ala Pro Lys Gln Glu Ile Gln
 130 135 140

Phe Ala Asp Gly Ser Val Glu His Leu Trp Asn Thr Phe Gly Glu Glu
145 150 155 160

Gln Ile Asp Leu Asp Val Thr Lys Glu Val Thr Met Asp Phe Ile Arg
 165 170 175

Ser Thr Ile Glu Asn Leu Ala Ala Asn Gly Cys Asp Leu Ile Arg Leu
180 185 190

Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Leu Asp Thr Asn Asp Phe Phe
195 200 205

Val Glu Pro Glu Ile Trp Thr Leu Leu Asp Lys Val Arg Asp Ile Ala
210 215 220

Ala Val Ser Gly Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile His Glu His Tyr Thr
225 230 235 240

Ile Gln Phe Lys Ile Ala Asp His Asp Tyr Tyr Val Tyr Asp Phe Ala
245 250 255

Leu Pro Met Val Thr Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Lys Val Asp Arg
260 265 270

Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu
275 280 285

Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr
290 295 300

Asp Glu Glu Ile Thr Tyr Thr Ser Asn Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala
305 310 315 320

Asn Val Asn Arg Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile
325 330 335

Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Gln
340 345 350

Lys Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Tyr Val Gly Phe Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Glu Leu
370 375 380

Leu Glu Ser Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser
385 390 395 400

Ser Glu Glu Ile Ala Lys Glu Val Lys Arg Pro Val Val Lys Ala Leu
405 410 415

Leu Asn Leu Phe Thr Tyr Arg Asn Gln Ser Ala Ala Phe Asp Leu Asp
420 425 430

Gly Arg Ile Glu Val Glu Thr Pro Asn Glu Ala Thr Ile Val Ile Glu
435 440 445

Arg Gln Asn Lys Asp Gly Ser His Ile Ala Thr Ala Glu Ile Asn Leu
450 455 460

Gln Asp Met Thr Tyr Arg Val Thr Glu Asn Asp Gln Thr Ile Ser Phe
465 470 475 480

Glu

<210> 3
<211> 1434
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1434)

<400> 3
atg cca att caa aat aaa acc atg ttg att acc tat tct gat agc ctt 48
Met Pro Ile Gln Asn Lys Thr Met Leu Ile Thr Tyr Ser Asp Ser Leu
1 5 10 15

gga aat aat ctt aaa gac tta tat gat aat ttg gaa gag cat ttt gga 96
Gly Asn Asn Leu Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Leu Glu Glu His Phe Gly
20 25 30

gat gct att gga gga gtt cac ctt tta cca ttt ttc cca tca aca gtt 144

Asp	Ala	Ile	Gly	Gly	Val	His	Leu	Leu	Pro	Phe	Phe	Pro	Ser	Thr	Val	
	35						40					45				
gat	cgt	gga	ttt	gcg	cca	gtt	gac	tac	gac	gaa	gtg	gac	tca	gct	ttt	192
Asp	Arg	Gly	Phe	Ala	Pro	Val	Asp	Tyr	Asp	Glu	Val	Asp	Ser	Ala	Phe	
	50					55				60						
ggt	gat	tgg	gag	gat	gtg	aag	cgt	tta	ggt	gag	aaa	tat	tat	ctt	atg	240
Gly	Asp	Trp	Glu	Asp	Val	Lys	Arg	Leu	Gly	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Leu	Met	
65					70				75					80		
ttt	gat	ttt	atg	att	aat	cat	att	tct	cgt	caa	tcc	aag	tat	tat	aag	288
Phe	Asp	Phe	Met	Ile	Asn	His	Ile	Ser	Arg	Gln	Ser	Lys	Tyr	Tyr	Lys	
			85					90						95		
gac	tat	caa	gaa	aaa	cat	gaa	gcc	agt	gaa	ttt	aaa	gct	ctc	ttt	tta	336
Asp	Tyr	Gln	Glu	Lys	His	Glu	Ala	Ser	Glu	Phe	Lys	Ala	Leu	Phe	Leu	
		100						105					110			
aac	tgg	gat	aag	ttt	tgg	cca	gaa	aac	cgt	ccg	aca	cag	tct	gat	gta	384
Asn	Trp	Asp	Lys	Phe	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Pro	Thr	Gln	Ser	Asp	Val	
	115					120						125				
gat	tta	att	tac	aag	cgt	aag	gat	cgt	gca	cca	aag	caa	gag	att	gtg	432
Asp	Leu	Ile	Tyr	Lys	Arg	Lys	Asp	Arg	Ala	Pro	Lys	Gln	Glu	Ile	Val	
	130					135					140					
ttt	gaa	gat	ggt	tca	gtg	gaa	cat	ttg	tgg	aat	acc	ttt	ggt	gag	gag	480
Phe	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Leu	Trp	Asn	Thr	Phe	Gly	Glu	Glu	
145					150				155					160		
cag	att	gat	ctt	gat	gtg	acc	aaa	gaa	gta	act	atg	gaa	ttt	atc	cgt	528
Gln	Ile	Asp	Leu	Asp	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Thr	Met	Glu	Phe	Ile	Arg	
			165					170					175			
aag	acc	att	cag	cac	ttg	gca	agt	aat	ggg	tgt	gat	ttg	att	cgt	cta	576
Lys	Thr	Ile	Gln	His	Leu	Ala	Ser	Asn	Gly	Cys	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	
			180					185					190			
gat	gcc	ttt	gct	tat	gca	gtg	aag	aaa	ttg	gat	act	aat	gat	ttc	ttt	624
Asp	Ala	Phe	Ala	Tyr	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Asp	Thr	Asn	Asp	Phe	Phe	
		195					200					205				
gtg	gaa	cca	gat	att	tgg	gat	tta	ttg	gac	aaa	gtt	cga	gat	atc	gct	672
Val	Glu	Pro	Asp	Ile	Trp	Asp	Leu	Leu	Asp	Lys	Val	Arg	Asp	Ile	Ala	
	210					215					220					
gct	gag	tat	ggg	aca	gag	ctt	tta	cct	gag	att	cat	gaa	cac	tat	tcg	720
Ala	Glu	Tyr	Gly	Thr	Glu	Leu	Leu	Pro	Glu	Ile	His	Glu	His	Tyr	Ser	
225					230				235					240		

att cag ttt aaa ata gca gac cat gat tac tat gtt tat gat ttt gct Ile Gln Phe Lys Ile Ala Asp His Asp Tyr Tyr Val Tyr Asp Phe Ala 245 250 255	768
ctt cca atg gtg aca ctt tat act ctt tac agt tcc aga aca gag cgt Leu Pro Met Val Thr Leu Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Arg Thr Glu Arg 260 265 270	816
ttg gct aag tgg tta aag atg agc ccg atg aag caa ttt acg acg cta Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu 275 280 285	864
gat acc cat gat ggg att gga gta gta gat gtc aag gat atc ctg acc Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr 290 295 300	912
gat gag gag att gac tat gct tca aat gaa ctc tat aag gtt gga gcc Asp Glu Glu Ile Asp Tyr Ala Ser Asn Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala 305 310 315 320	960
aat gtc aaa cgt aag tac tct agt gcc gag tat aac aac tta gat atc Asn Val Lys Arg Lys Tyr Ser Ser Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile 325 330 335	1008
tac caa atc aat tca acc tac tat tca gcg ctt gga gat gat gat gtc Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Val 340 345 350	1056
aag tat ttt ctc gct cgt cta att caa gct ttt gcc cca ggt att cct Lys Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro 355 360 365	1104
cag att tac tat gtg ggt cta tta gca ggc aag aat gac ttg aaa tta Gln Ile Tyr Tyr Val Gly Leu Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Lys Leu 370 375 380	1152
tta gaa gaa act aaa gaa ggt cga aat att aat cgt cat tac tat agc Leu Glu Glu Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser 385 390 395 400	1200
aac gag gaa ata gca aaa gaa gtg caa cga cct gtt gtg aag gcc ctt Asn Glu Glu Ile Ala Lys Glu Val Gln Arg Pro Val Val Lys Ala Leu 405 410 415	1248
ctc aat cta ttt tct ttc cgt aac cgt tca gaa gcc ttt gat cta gaa Leu Asn Leu Phe Ser Phe Arg Asn Arg Ser Glu Ala Phe Asp Leu Glu 420 425 430	1296
ggg act act gag ata gag aca cca aca gct cac agc att gta atc aaa	1344

Gly Thr Thr Glu Ile Glu Thr Pro Thr Ala His Ser Ile Val Ile Lys
435 440 445

cgt caa aat aaa gat aag tcc gta aca gca gta gta gaa att gat ttg 1392
Arg Gln Asn Lys Asp Lys Ser Val Thr Ala Val Val Glu Ile Asp Leu
450 455 460

caa aat cag act tat cgg gta att gag aat gga gtt gaa gta 1434
Gln Asn Gln Thr Tyr Arg Val Ile Glu Asn Gly Val Glu Val
465 470 475

<210> 4
<211> 478
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4

Met Pro Ile Gln Asn Lys Thr Met Leu Ile Thr Tyr Ser Asp Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asn Asn Leu Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Leu Glu Glu His Phe Gly
20 25 30

Asp Ala Ile Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Thr Val
35 40 45

Asp Arg Gly Phe Ala Pro Val Asp Tyr Asp Glu Val Asp Ser Ala Phe
50 55 60

Gly Asp Trp Glu Asp Val Lys Arg Leu Gly Glu Lys Tyr Tyr Leu Met
65 70 75 80

Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Gln Ser Lys Tyr Tyr Lys
85 90 95

Asp Tyr Gln Glu Lys His Glu Ala Ser Glu Phe Lys Ala Leu Phe Leu
100 105 110

Asn Trp Asp Lys Phe Trp Pro Glu Asn Arg Pro Thr Gln Ser Asp Val
115 120 125

Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Arg Ala Pro Lys Gln Glu Ile Val
130 135 140

Phe Glu Asp Gly Ser Val Glu His Leu Trp Asn Thr Phe Gly Glu Glu
145 150 155 160

Gln Ile Asp Leu Asp Val Thr Lys Glu Val Thr Met Glu Phe Ile Arg
165 170 175

Lys Thr Ile Gln His Leu Ala Ser Asn Gly Cys Asp Leu Ile Arg Leu
180 185 190

Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Leu Asp Thr Asn Asp Phe Phe
195 200 205

Val Glu Pro Asp Ile Trp Asp Leu Leu Asp Lys Val Arg Asp Ile Ala
210 215 220

Ala Glu Tyr Gly Thr Glu Leu Leu Pro Glu Ile His Glu His Tyr Ser
225 230 235 240

Ile Gln Phe Lys Ile Ala Asp His Asp Tyr Tyr Val Tyr Asp Phe Ala
245 250 255

Leu Pro Met Val Thr Leu Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Arg Thr Glu Arg
260 265 270

Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu
275 280 285

Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr
290 295 300

Asp Glu Glu Ile Asp Tyr Ala Ser Asn Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala
305 310 315 320

Asn Val Lys Arg Lys Tyr Ser Ser Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile

325

330

335

Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Val
340 345 350

Lys Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro
355 360 365

Gln Ile Tyr Tyr Val Gly Leu Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Lys Leu
370 375 380

Leu Glu Glu Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser
385 390 395 400

Asn Glu Glu Ile Ala Lys Glu Val Gln Arg Pro Val Val Lys Ala Leu
405 410 415

Leu Asn Leu Phe Ser Phe Arg Asn Arg Ser Glu Ala Phe Asp Leu Glu
420 425 430

Gly Thr Thr Glu Ile Glu Thr Pro Thr Ala His Ser Ile Val Ile Lys
435 440 445

Arg Gln Asn Lys Asp Lys Ser Val Thr Ala Val Val Glu Ile Asp Leu
450 455 460

Gln Asn Gln Thr Tyr Arg Val Ile Glu Asn Gly Val Glu Val
465 470 475

<210> 5
<211> 1443
<212> DNA
<213> Streptococcus sorbinus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1443)

<400> 5

atg aca cta aca aat aaa acg atg tta att acc tac tca gat agt tta Met Thr Leu Thr Asn Lys Thr Met Leu Ile Thr Tyr Ser Asp Ser Leu 1 5 10 15	48
ggt agg aac cta aaa gag ctg gat gaa aat atc agc atc tat ttt gga Gly Arg Asn Leu Lys Glu Leu Asp Glu Asn Ile Ser Ile Tyr Phe Gly 20 25 30	96
gat gca att gga ggc gtc cat ctc ctg cct ttc ttc ccc tcg aca gga Asp Ala Ile Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Thr Gly 35 40 45	144
gat agg gga ttc gct cca gtt gat tac gat aag gtg gat cct gct ttt Asp Arg Gly Phe Ala Pro Val Asp Tyr Asp Lys Val Asp Pro Ala Phe 50 55 60	192
ggt gac tgg gat gat gtc aaa cgt tta ggt gct aaa tac tac ctg atg Gly Asp Trp Asp Asp Val Lys Arg Leu Gly Ala Lys Tyr Tyr Leu Met 65 70 75 80	240
ttt gat ttt atg att aat cat atc tcc cgt caa tct aag tat tat aag Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Gln Ser Lys Tyr Tyr Lys 85 90 95	288
gat ttt caa gag aaa aaa gat gct tct gac tat gcg gat tta ttt ctg Asp Phe Gln Glu Lys Lys Asp Ala Ser Asp Tyr Ala Asp Leu Phe Leu 100 105 110	336
cgc tgg gaa aaa ttc tgg ccg gaa aac cgt ccc acc caa gca gat att Arg Trp Glu Lys Phe Trp Pro Glu Asn Arg Pro Thr Gln Ala Asp Ile 115 120 125	384
gat tta att tat aaa cgt aaa gac aag gct cct atg cag gag att gtc Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Lys Ala Pro Met Gln Glu Ile Val 130 135 140	432
ttc gcc gat gga acc aaa gaa cat ctc tgg aat act ttc gga gaa gag Phe Ala Asp Gly Thr Lys Glu His Leu Trp Asn Thr Phe Gly Glu Glu 145 150 155 160	480
caa att gat cta gat gtt act aaa gaa gtg acc atg gac ttt atc aaa Gln Ile Asp Leu Asp Val Thr Lys Glu Val Thr Met Asp Phe Ile Lys 165 170 175	528
aaa aac atc gag cat cta gca gtc aat ggt tgt gat ctc att cgc ctg Lys Asn Ile Glu His Leu Ala Val Asn Gly Cys Asp Leu Ile Arg Leu 180 185 190	576
gat gcc ttt gcc tac gcc gtg aaa aaa ttg gac act aat gat ttc ttt Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Leu Asp Thr Asn Asp Phe Phe 624	

195	200	205	
gtc gaa cca gaa att tgg gat ctc cta acc aag gta cag aca atc gcc Val Glu Pro Glu Ile Trp Asp Leu Leu Thr Lys Val Gln Thr Ile Ala 210 215 220			672
aag gaa gca ggg gca gat atc ctg ccg gaa ata cat gag cat tat tct Lys Glu Ala Gly Ala Asp Ile Leu Pro Glu Ile His Glu His Tyr Ser 225 230 235 240			720
atc cag ttc aaa att gct gag cat gac tat ttc att tat gat ttt gcc Ile Gln Phe Lys Ile Ala Glu His Asp Tyr Phe Ile Tyr Asp Phe Ala 245 250 255			768
ctt cca atg gta acc ctt tac tct ctt tat agc ggt agg gtg caa cgt Leu Pro Met Val Thr Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Arg Val Gln Arg 260 265 270			816
ttg gca gat tgg ctg gct aaa agt cct atg aag caa ttt act acg ctg Leu Ala Asp Trp Leu Ala Lys Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu 275 280 285			864
gat acc cat gat ggc att gga gtt gta gat gtt aaa gat atc ttg aca Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr 290 295 300			912
gac gag gaa att gct tac act tcc gat caa ctc tac aag gtt gga gcc Asp Glu Glu Ile Ala Tyr Thr Ser Asp Gln Leu Tyr Lys Val Gly Ala 305 310 315 320			960
aac gtc aat cgc aaa tat tca acg gca gaa tat aat aac ctt gat att Asn Val Asn Arg Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile 325 330 335			1008
tat caa atc aac tcg acc tac tat tca gcc ctt ggt gac gat gac aag Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Lys 340 345 350			1056
aag tat ttc tta gct cgt ctc att caa gct ttt gca cca ggg att cca Lys Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro 355 360 365			1104
caa gtt tat tat gtt gga ctt ttg gct gga aaa aac gat ctg aag ctc Gln Val Tyr Tyr Val Gly Leu Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Lys Leu 370 375 380			1152
ttg gaa aaa acc aag gaa ggt cgc aat atc aat cgt cat tat tat agc Leu Glu Lys Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser 385 390 395 400			1200

agt gaa gag att gct cac gag gtt gaa cgg cca gtt gtc aaa gct ttg 1248
Ser Glu Glu Ile Ala His Glu Val Glu Arg Pro Val Val Lys Ala Leu
405 410 415

atc aaa ctg ttt agc tat cgc aac aac tct caa gct ttc gac tta gac 1296
Ile Lys Leu Phe Ser Tyr Arg Asn Asn Ser Gln Ala Phe Asp Leu Asp
420 425 430

ggc agc ctt gaa acg gaa gtt ctg gat gac cac acc atc gtt atc aag 1344
Gly Ser Leu Glu Thr Glu Val Leu Asp Asp His Thr Ile Val Ile Lys
435 440 445

cgt tct aat cag gac aag agt gct tta gct caa gct gtt att aat ttg 1392
Arg Ser Asn Gln Asp Lys Ser Ala Leu Ala Gln Ala Val Ile Asn Leu
450 455 460

caa gat tta acc tat cag gtc act gag aat ggt caa acc att aca ttc 1440
Gln Asp Leu Thr Tyr Gln Val Thr Glu Asn Gly Gln Thr Ile Thr Phe
465 470 475 480

gaa 1443
Glu

<210> 6
<211> 481
<212> PRT
<213> Streptococcus sorbinus

<400> 6

Met Thr Leu Thr Asn Lys Thr Met Leu Ile Thr Tyr Ser Asp Ser Leu
1 5 10 15

Gly Arg Asn Leu Lys Glu Leu Asp Glu Asn Ile Ser Ile Tyr Phe Gly
20 25 30

Asp Ala Ile Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Thr Gly
35 40 45

Asp Arg Gly Phe Ala Pro Val Asp Tyr Asp Lys Val Asp Pro Ala Phe
50 55 60

Gly Asp Trp Asp Asp Val Lys Arg Leu Gly Ala Lys Tyr Tyr Leu Met
65 70 75 80

Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Gln Ser Lys Tyr Tyr Lys
85 90 95

Asp Phe Gln Glu Lys Lys Asp Ala Ser Asp Tyr Ala Asp Leu Phe Leu
100 105 110

Arg Trp Glu Lys Phe Trp Pro Glu Asn Arg Pro Thr Gln Ala Asp Ile
115 120 125

Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Lys Ala Pro Met Gln Glu Ile Val
130 135 140

Phe Ala Asp Gly Thr Lys Glu His Leu Trp Asn Thr Phe Gly Glu Glu
145 150 155 160

Gln Ile Asp Leu Asp Val Thr Lys Glu Val Thr Met Asp Phe Ile Lys
165 170 175

Lys Asn Ile Glu His Leu Ala Val Asn Gly Cys Asp Leu Ile Arg Leu
180 185 190

Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Leu Asp Thr Asn Asp Phe Phe
195 200 205

Val Glu Pro Glu Ile Trp Asp Leu Leu Thr Lys Val Gln Thr Ile Ala
210 215 220

Lys Glu Ala Gly Ala Asp Ile Leu Pro Glu Ile His Glu His Tyr Ser
225 230 235 240

Ile Gln Phe Lys Ile Ala Glu His Asp Tyr Phe Ile Tyr Asp Phe Ala
245 250 255

Leu Pro Met Val Thr Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Arg Val Gln Arg
260 265 270

Leu Ala Asp Trp Leu Ala Lys Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu
275 280 285

Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr
290 295 300

Asp Glu Glu Ile Ala Tyr Thr Ser Asp Gln Leu Tyr Lys Val Gly Ala
305 310 315 320

Asn Val Asn Arg Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile
325 330 335

Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Lys
340 345 350

Lys Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Tyr Val Gly Leu Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Lys Leu
370 375 380

Leu Glu Lys Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser
385 390 395 400

Ser Glu Glu Ile Ala His Glu Val Glu Arg Pro Val Val Lys Ala Leu
405 410 415

Ile Lys Leu Phe Ser Tyr Arg Asn Asn Ser Gln Ala Phe Asp Leu Asp
420 425 430

Gly Ser Leu Glu Thr Glu Val Leu Asp Asp His Thr Ile Val Ile Lys
435 440 445

Arg Ser Asn Gln Asp Lys Ser Ala Leu Ala Gln Ala Val Ile Asn Leu
450 455 460

Gln Asp Leu Thr Tyr Gln Val Thr Glu Asn Gly Gln Thr Ile Thr Phe
465 470 475 480

Glu

<210> 7
 <211> 1470
 <212> DNA
 <213> Leuconostoc mesenteroides

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1470)

<400> 7
 atg gaa att caa aac aaa gca atg ttg atc act tat gct gat tcg ttg 48
 Met Glu Ile Gln Asn Lys Ala Met Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Leu
 1 5 10 15
 ggc aaa aac tta aaa gat gtt cat caa gtc ttg aaa gaa gat att gga 96
 Gly Lys Asn Leu Lys Asp Val His Gln Val Leu Lys Glu Asp Ile Gly
 20 25 30
 gat gcg att ggt ggg gtt cat ttg ttg cct ttc ttc cct tca aca ggt 144
 Asp Ala Ile Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Thr Gly
 35 40 45
 gat cgc ggt ttt gcg cca gcc gat tat act cgt gtt gat gcc gca ttt 192
 Asp Arg Gly Phe Ala Pro Ala Asp Tyr Thr Arg Val Asp Ala Ala Phe
 50 55 60
 ggt gat tgg gca gat gtc gaa gca ttg ggt gaa gaa tac tat ttg atg 240
 Gly Asp Trp Ala Asp Val Glu Ala Leu Gly Glu Glu Tyr Tyr Leu Met
 65 70 75 80
 ttt gac ttc atg att aac cat att tct cgt gaa tca gtg atg tat caa 288
 Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Glu Ser Val Met Tyr Gln
 85 90 95
 gat ttt aag aag aat cat gac gat tca aag tat aaa gat ttc ttt att 336
 Asp Phe Lys Lys Asn His Asp Asp Ser Lys Tyr Lys Asp Phe Phe Ile
 100 105 110
 cgt tgg gaa aag ttc tgg gca aag gcc ggc gaa aac cgt cca aca caa 384
 Arg Trp Glu Lys Phe Trp Ala Lys Ala Gly Glu Asn Arg Pro Thr Gln
 115 120 125
 gcc gat gtt gac tta att tac aag cgt aaa gat aag gca cca acg caa 432

Ala Asp Val Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Lys Ala Pro Thr Gln	
130 135 140	
gaa atc act ttt gat gat ggc aca aca gaa aac ttg tgg aat act ttt	480
Glu Ile Thr Phe Asp Asp Gly Thr Thr Glu Asn Leu Trp Asn Thr Phe	
145 150 155 160	
ggt gaa gaa caa att gac att gat gtt aat tca gcc att gcc aag gaa	528
Gly Glu Glu Gln Ile Asp Ile Asp Val Asn Ser Ala Ile Ala Lys Glu	
165 170 175	
ttt att aag aca acc ctt gaa gac atg gta aaa cat ggt gct aac ttg	576
Phe Ile Lys Thr Thr Leu Glu Asp Met Val Lys His Gly Ala Asn Leu	
180 185 190	
att cgt ttg gat gcc ttt gcg tat gca gtt aaa aaa gtt gac aca aat	624
Ile Arg Leu Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Val Asp Thr Asn	
195 200 205	
gac ttc ttc gtt gag cca gaa atc tgg gac act ttg aat gaa gta cgt	672
Asp Phe Phe Val Glu Pro Glu Ile Trp Asp Thr Leu Asn Glu Val Arg	
210 215 220	
gaa att ttg aca cca tta aag gct gaa att tta cca gaa att cat gaa	720
Glu Ile Leu Thr Pro Leu Lys Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile His Glu	
225 230 235 240	
cat tac tca atc cct aaa aag atc aat gat cat ggt tac ttc acc tat	768
His Tyr Ser Ile Pro Lys Lys Ile Asn Asp His Gly Tyr Phe Thr Tyr	
245 250 255	
gac ttt gca tta cca atg aca acg ctt tac aca ttg tat tca ggt aag	816
Asp Phe Ala Leu Pro Met Thr Thr Leu Tyr Thr Leu Tyr Ser Gly Lys	
260 265 270	
aca aat caa ttg gca aag tgg ttg aag atg tca cca atg aag caa ttc	864
Thr Asn Gln Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe	
275 280 285	
aca aca ttg gac acg cat gat ggt att ggt gtc gtt gat gcc cgt gat	912
Thr Thr Leu Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Ala Arg Asp	
290 295 300	
att cta act gat gat gaa att gac tac gct tct gaa caa ctt tac aag	960
Ile Leu Thr Asp Asp Glu Ile Asp Tyr Ala Ser Glu Gln Leu Tyr Lys	
305 310 315 320	
ggt ggc gcg aat gtc aaa aag aca tat tca tct gct tca tac aac aac	1008
Val Gly Ala Asn Val Lys Lys Thr Tyr Ser Ser Ala Ser Tyr Asn Asn	
325 330 335	

1 5 10 15
Gly Lys Asn Leu Lys Asp Val His Gln Val Leu Lys Glu Asp Ile Gly
20 25 30
Asp Ala Ile Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Thr Gly
35 40 45
Asp Arg Gly Phe Ala Pro Ala Asp Tyr Thr Arg Val Asp Ala Ala Phe
50 55 60
Gly Asp Trp Ala Asp Val Glu Ala Leu Gly Glu Glu Tyr Tyr Leu Met
65 70 75 80
Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Glu Ser Val Met Tyr Gln
85 90 95
Asp Phe Lys Lys Asn His Asp Asp Ser Lys Tyr Lys Asp Phe Phe Ile
100 105 110
Arg Trp Glu Lys Phe Trp Ala Lys Ala Gly Glu Asn Arg Pro Thr Gln
115 120 125
Ala Asp Val Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Lys Ala Pro Thr Gln
130 135 140
Glu Ile Thr Phe Asp Asp Gly Thr Thr Glu Asn Leu Trp Asn Thr Phe
145 150 155 160
Gly Glu Glu Gln Ile Asp Ile Asp Val Asn Ser Ala Ile Ala Lys Glu
165 170 175
Phe Ile Lys Thr Thr Leu Glu Asp Met Val Lys His Gly Ala Asn Leu
180 185 190
Ile Arg Leu Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Val Asp Thr Asn
195 200 205

Asp Phe Phe Val Glu Pro Glu Ile Trp Asp Thr Leu Asn Glu Val Arg
210 215 220

Glu Ile Leu Thr Pro Leu Lys Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile His Glu
225 230 235 240

His Tyr Ser Ile Pro Lys Lys Ile Asn Asp His Gly Tyr Phe Thr Tyr
245 250 255

Asp Phe Ala Leu Pro Met Thr Thr Leu Tyr Thr Leu Tyr Ser Gly Lys
260 265 270

Thr Asn Gln Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe
275 280 285

Thr Thr Leu Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Ala Arg Asp
290 295 300

Ile Leu Thr Asp Asp Glu Ile Asp Tyr Ala Ser Glu Gln Leu Tyr Lys
305 310 315 320

Val Gly Ala Asn Val Lys Lys Thr Tyr Ser Ser Ala Ser Tyr Asn Asn
325 330 335

Leu Asp Ile Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asn
340 345 350

Asp Asp Ala Ala Tyr Leu Leu Ser Arg Val Phe Gln Val Phe Ala Pro
355 360 365

Gly Ile Pro Gln Ile Tyr Tyr Val Gly Leu Leu Ala Gly Glu Asn Asp
370 375 380

Ile Ala Leu Leu Glu Ser Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His
385 390 395 400

Tyr Tyr Thr Arg Glu Glu Val Lys Ser Glu Val Lys Arg Pro Val Val

405

410

415

Ala Asn Leu Leu Lys Leu Leu Ser Trp Arg Asn Glu Ser Pro Ala Phe
420 425 430

Asp Leu Ala Gly Ser Ile Thr Val Asp Thr Pro Thr Asp Thr Thr Ile
435 440 445

Val Val Thr Arg Gln Asp Glu Asn Gly Gln Asn Lys Ala Val Leu Thr
450 455 460

Ala Asp Ala Ala Asn Lys Thr Phe Glu Ile Val Glu Asn Gly Gln Thr
465 470 475 480

Val Met Ser Ser Asp Asn Leu Thr Gln Asn
485 490

<210> 9
<211> 1467
<212> DNA
<213> Oenococcus oeni

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1467)

<400> 9
atg ccg gtt aaa aat aaa gca atg ctg atc acc tat tcg gat tcg atg 48
Met Pro Val Lys Asn Lys Ala Met Leu Ile Thr Tyr Ser Asp Ser Met
1 5 10 15
ggt aag aat atc aag gaa tta caa tac att tta gat aaa tat att gga 96
Gly Lys Asn Ile Lys Glu Leu Gln Tyr Ile Leu Asp Lys Tyr Ile Gly
20 25 30
gac gcg att ggt gga gtt cat ctg ctg cct ttt ttt ccg tca acc gga 144
Asp Ala Ile Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Thr Gly
35 40 45
gat cgt ggt ttt gcg ccc tcg gat tac act cgt gtc aat ccg gat ttc 192
Asp Arg Gly Phe Ala Pro Ser Asp Tyr Thr Arg Val Asn Pro Asp Phe
50 55 60

ggt gat tgg gag gat gtc gag gaa ctt gga aaa aag tat tat tta atg Gly Asp Trp Glu Asp Val Glu Glu Leu Gly Lys Lys Tyr Tyr Leu Met 65 70 75 80	240
ttt gat ttc atg att aat cac att tcc cgt gaa tcg att atg tat caa Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Glu Ser Ile Met Tyr Gln 85 90 95	288
gat ttc aag gaa aaa aag gat gct tcc agc tac aag gac ttt ttt att Asp Phe Lys Glu Lys Lys Asp Ala Ser Ser Tyr Lys Asp Phe Phe Ile 100 105 110	336
cgt tgg gaa aag ttc tgg ccg aaa gga cgc ccg acg aag gcc gat atc Arg Trp Glu Lys Phe Trp Pro Lys Gly Arg Pro Thr Lys Ala Asp Ile 115 120 125	384
gat tta att tac aaa aga aaa gat aag gcg ccg att cag ggg att act Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Lys Ala Pro Ile Gln Gly Ile Thr 130 135 140	432
ttt gca gac ggc agt caa gaa cat ctt tgg aat act ttt ggc gat gag Phe Ala Asp Gly Ser Gln Glu His Leu Trp Asn Thr Phe Gly Asp Glu 145 150 155 160	480
cag atc gat att aac gtg aag tcc aaa gtt gct cag gaa ttt ttt aaa Gln Ile Asp Ile Asn Val Lys Ser Lys Val Ala Gln Glu Phe Phe Lys 165 170 175	528
gat act tta cag tca atg gtt aag cac ggt gcg gat ttg att cgc ctg Asp Thr Leu Gln Ser Met Val Lys His Gly Ala Asp Leu Ile Arg Leu 180 185 190	576
gat gcc ttt gct tat gca att aaa aag att gat act aat gac ttc ttt Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Ile Lys Lys Ile Asp Thr Asn Asp Phe Phe 195 200 205	624
att gaa ccg gaa att tgg gat tta ctg gaa tca gtt cgg aag att ctc Ile Glu Pro Glu Ile Trp Asp Leu Leu Glu Ser Val Arg Lys Ile Leu 210 215 220	672
gac ccc cta cat gct gaa att tta ccg gaa att tat gaa cat tac aca Asp Pro Leu His Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile Tyr Glu His Tyr Thr 225 230 235 240	720
atc ccg gcc aaa ata aat gag tat ggt tac ttt acc tat gat ttt gtt Ile Pro Ala Lys Ile Asn Glu Tyr Gly Tyr Phe Thr Tyr Asp Phe Val 245 250 255	768
tta cct ctg gta att ttg tac act ctt tat tct gga aat ccc aag caa Leu Pro Leu Val Ile Leu Tyr Thr Leu Tyr Ser Gly Asn Pro Lys Gln	816

260	265	270	
ttg gcc aaa tgg ttg aaa atg tca cca aaa aaa cag ttt acg act ctt			864
Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Lys Lys Gln Phe Thr Thr Leu			
275	280	285	
gat act cat gat gga atc ggg gtt gtt gat gct cgc gat att tta act			912
Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Ala Arg Asp Ile Leu Thr			
290	295	300	
gat gag gaa atc gac tat act tcc agt gaa ctg tat aaa gtt ggt gcg			960
Asp Glu Glu Ile Asp Tyr Thr Ser Ser Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala			
305	310	315	320
aac gtc aaa cgg act tat tca tct gcg gcc tat aat aat ttg gat att			1008
Asn Val Lys Arg Thr Tyr Ser Ser Ala Ala Tyr Asn Asn Leu Asp Ile			
325	330	335	
tac cag att aac tcg acc tat tat tca gct ctt ggc aat gat gac aaa			1056
Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asn Asp Asp Lys			
340	345	350	
gcc tat ttg ctt gcc cgt gca ata caa att ttt gcc ccg gga att cca			1104
Ala Tyr Leu Leu Ala Arg Ala Ile Gln Ile Phe Ala Pro Gly Ile Pro			
355	360	365	
caa atc tat tac gca ggc ctg ctg gct ggt gaa aac gat ttg gat ttg			1152
Gln Ile Tyr Tyr Ala Gly Leu Leu Ala Gly Glu Asn Asp Leu Asp Leu			
370	375	380	
ttg gaa aag acc aag gaa gga cgc aat ata aat cgt cat tat tac agt			1200
Leu Glu Lys Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser			
385	390	395	400
gaa gaa gaa gtt gcc aat gaa gtg cag aga cca att gtt gcc tgc cta			1248
Glu Glu Glu Val Ala Asn Glu Val Gln Arg Pro Ile Val Ala Cys Leu			
405	410	415	
ctg aaa ttg ttg gct tgg cgc aat cgc agt gcc gct ttt gat ctt caa			1296
Leu Lys Leu Leu Ala Trp Arg Asn Arg Ser Ala Ala Phe Asp Leu Gln			
420	425	430	
gga gat att caa gtc agc gca acc gac aaa aat gaa atc aaa att att			1344
Gly Asp Ile Gln Val Ser Ala Thr Asp Lys Asn Glu Ile Lys Ile Ile			
435	440	445	
cga act tca acc aat ggc caa gac acc gcg gaa tta acc gct aat gtg			1392
Arg Thr Ser Thr Asn Gly Gln Asp Thr Ala Glu Leu Thr Ala Asn Val			
450	455	460	

gct cta aaa acc ttt act ata aag gaa aat gat aaa att att tta att 1440
 Ala Leu Lys Thr Phe Thr Ile Lys Glu Asn Asp Lys Ile Ile Leu Ile
 465 470 475 480

gaa gat cag act gat aca aag gat atc 1467
 Glu Asp Gln Thr Asp Thr Lys Asp Ile
 485

<210> 10
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> Oenococcus oeni

<400> 10

Met Pro Val Lys Asn Lys Ala Met Leu Ile Thr Tyr Ser Asp Ser Met
 1 5 10 15

Gly Lys Asn Ile Lys Glu Leu Gln Tyr Ile Leu Asp Lys Tyr Ile Gly
 20 25 30

Asp Ala Ile Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Thr Gly
 35 40 45

Asp Arg Gly Phe Ala Pro Ser Asp Tyr Thr Arg Val Asn Pro Asp Phe
 50 55 60

Gly Asp Trp Glu Asp Val Glu Glu Leu Gly Lys Lys Tyr Tyr Leu Met
 65 70 75 80

Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Glu Ser Ile Met Tyr Gln
 85 90 95

Asp Phe Lys Glu Lys Lys Asp Ala Ser Ser Tyr Lys Asp Phe Phe Ile
 100 105 110

Arg Trp Glu Lys Phe Trp Pro Lys Gly Arg Pro Thr Lys Ala Asp Ile
 115 120 125

Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Lys Ala Pro Ile Gln Gly Ile Thr
 130 135 140

Phe Ala Asp Gly Ser Gln Glu His Leu Trp Asn Thr Phe Gly Asp Glu
145 150 155 160

Gln Ile Asp Ile Asn Val Lys Ser Lys Val Ala Gln Glu Phe Phe Lys
165 170 175

Asp Thr Leu Gln Ser Met Val Lys His Gly Ala Asp Leu Ile Arg Leu
180 185 190

Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Ile Lys Lys Ile Asp Thr Asn Asp Phe Phe
195 200 205

Ile Glu Pro Glu Ile Trp Asp Leu Leu Glu Ser Val Arg Lys Ile Leu
210 215 220

Asp Pro Leu His Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile Tyr Glu His Tyr Thr
225 230 235 240

Ile Pro Ala Lys Ile Asn Glu Tyr Gly Tyr Phe Thr Tyr Asp Phe Val
245 250 255

Leu Pro Leu Val Ile Leu Tyr Thr Leu Tyr Ser Gly Asn Pro Lys Gln
260 265 270

Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Lys Lys Gln Phe Thr Thr Leu
275 280 285

Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Ala Arg Asp Ile Leu Thr
290 295 300

Asp Glu Glu Ile Asp Tyr Thr Ser Ser Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala
305 310 315 320

Asn Val Lys Arg Thr Tyr Ser Ser Ala Ala Tyr Asn Asn Leu Asp Ile
325 330 335

Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asn Asp Asp Lys
340 345 350

Ala Tyr Leu Leu Ala Arg Ala Ile Gln Ile Phe Ala Pro Gly Ile Pro
355 360 365

Gln Ile Tyr Tyr Ala Gly Leu Leu Ala Gly Glu Asn Asp Leu Asp Leu
370 375 380

Leu Glu Lys Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser
385 390 395 400

Glu Glu Glu Val Ala Asn Glu Val Gln Arg Pro Ile Val Ala Cys Leu
405 410 415

Leu Lys Leu Leu Ala Trp Arg Asn Arg Ser Ala Ala Phe Asp Leu Gln
420 425 430

Gly Asp Ile Gln Val Ser Ala Thr Asp Lys Asn Glu Ile Lys Ile Ile
435 440 445

Arg Thr Ser Thr Asn Gly Gln Asp Thr Ala Glu Leu Thr Ala Asn Val
450 455 460

Ala Leu Lys Thr Phe Thr Ile Lys Glu Asn Asp Lys Ile Ile Leu Ile
465 470 475 480

Glu Asp Gln Thr Asp Thr Lys Asp Ile
485

<210> 11
<211> 1524
<212> DNA
<213> Bifidobacterium longum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1524)

<400> 11

atg aaa aac aaa gtg caa ctc atc aca tac gcc gat cgt ctc ggc gat 48
 Met Lys Asn Lys Val Gln Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Arg Leu Gly Asp
 1 5 10 15

ggc act ctt agc tgc atg acc gac atc ctg cgc acc cgc ttc gac ggc 96
 Gly Thr Leu Ser Ser Met Thr Asp Ile Leu Arg Thr Arg Phe Asp Gly
 20 25 30

gtg tat gac ggc gtg cat atc ctg ccg ttc ttc act ccg ttc gat ggt 144
 Val Tyr Asp Gly Val His Ile Leu Pro Phe Phe Thr Pro Phe Asp Gly
 35 40 45

gcg gat gca ggc ttc gac ccg atc gac cat acc aaa gtc gac gaa cgt 192
 Ala Asp Ala Gly Phe Asp Pro Ile Asp His Thr Lys Val Asp Glu Arg
 50 55 60

ctc ggc agc tgg gac gac gtc gcc gaa ctc tcc aag acc cac aac atc 240
 Leu Gly Ser Trp Asp Asp Val Ala Glu Leu Ser Lys Thr His Asn Ile
 65 70 75 80

atg gtc gac gcc atc gtc aac cac atg agt tgg gaa tcc aag cag ttc 288
 Met Val Asp Ala Ile Val Asn His Met Ser Trp Glu Ser Lys Gln Phe
 85 90 95

caa gat gtg ctt gaa aaa ggt gag gaa tcc gag tat tac ccg atg ttt 336
 Gln Asp Val Leu Glu Lys Gly Glu Glu Ser Glu Tyr Tyr Pro Met Phe
 100 105 110

ctg acc atg agc tcc gtg ttc ccg aac ggc gcc acc gaa gag gac ctg 384
 Leu Thr Met Ser Ser Val Phe Pro Asn Gly Ala Thr Glu Glu Asp Leu
 115 120 125

gcc ggc atc tac cgt ccg cgt ccg ggc ctg ccg ttc acc cac tac aag 432
 Ala Gly Ile Tyr Arg Pro Arg Pro Gly Leu Pro Phe Thr His Tyr Lys
 130 135 140

ttc gcc ggc aag acg cgc ttg gtc tgg gtg agc ttc acc ccg cag cag 480
 Phe Ala Gly Lys Thr Arg Leu Val Trp Val Ser Phe Thr Pro Gln Gln
 145 150 155 160

gtt gat att gac acc gat tcc gac gag ggc tgg gaa tac ctc atg tgc 528
 Val Asp Ile Asp Thr Asp Ser Asp Glu Gly Trp Glu Tyr Leu Met Ser
 165 170 175

att ttc gac cag atg gcc gcc tct cac gtc agc tac atc cgc ctc gac 576
 Ile Phe Asp Gln Met Ala Ala Ser His Val Ser Tyr Ile Arg Leu Asp
 180 185 190

gcc gtc ggc tat ggc gcc aag gaa gcc agc acc agc tgc ttc atg acc 624

Ala Val Gly Tyr Gly Ala Lys Glu Ala Ser Thr Ser Cys Phe Met Thr	
195 200 205	
ccc aag acc ttt aag ctc atc tcc cgt ctg cgc gag gag ggc gtc aag	672
Pro Lys Thr Phe Lys Leu Ile Ser Arg Leu Arg Glu Glu Gly Val Lys	
210 215 220	
cgc ggc ctt gaa atc ctc atc gag gtt cac agc tat tac aag aag cag	720
Arg Gly Leu Glu Ile Leu Ile Glu Val His Ser Tyr Tyr Lys Lys Gln	
225 230 235 240	
gtg gag atc gcc tcc aag gtg gac cgc gtc tac gat ttc gcc ctg ccg	768
Val Glu Ile Ala Ser Lys Val Asp Arg Val Tyr Asp Phe Ala Leu Pro	
245 250 255	
ccg ctg ctt ctg cac tcg ctg ttc acc ggt cac gtc gaa ccc gtg gcc	816
Pro Leu Leu Leu His Ser Leu Phe Thr Gly His Val Glu Pro Val Ala	
260 265 270	
cac tgg acc gag atc cgc ccg aac aac gcc gtc acc gtg ctc gat acg	864
His Trp Thr Glu Ile Arg Pro Asn Asn Ala Val Thr Val Leu Asp Thr	
275 280 285	
cac gat ggc atc ggc gtg atc gac atc ggc tcc gac cag ctc gac cgc	912
His Asp Gly Ile Gly Val Ile Asp Ile Gly Ser Asp Gln Leu Asp Arg	
290 295 300	
tcc ctc aag ggc ctc gtg ccc gac gag gac gtc gac aac ctg gtc aac	960
Ser Leu Lys Gly Leu Val Pro Asp Glu Asp Val Asp Asn Leu Val Asn	
305 310 315 320	
acc atc cat gcc aac acc cac ggc gaa tcc cag gcc gcc acc ggt gcc	1008
Thr Ile His Ala Asn Thr His Gly Glu Ser Gln Ala Ala Thr Gly Ala	
325 330 335	
gcc gcg tcc aac ctc gac ctc tac cag gtc aac tcc acg tac tac tcg	1056
Ala Ala Ser Asn Leu Asp Leu Tyr Gln Val Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser	
340 345 350	
gcc ctc ggc tgc aac gac cag cac tac ttg gcc gcc cgc gcc gtg cag	1104
Ala Leu Gly Cys Asn Asp Gln His Tyr Leu Ala Ala Arg Ala Val Gln	
355 360 365	
ttc ttc ctg ccg ggc gtg ccg cag gtc tac tac gtg ggc gcg ctc gcc	1152
Phe Phe Leu Pro Gly Val Pro Gln Val Tyr Tyr Val Gly Ala Leu Ala	
370 375 380	
ggc cgc aac gac atg gaa ctg ctg cgc cgc acc aac aac ggc cgc gac	1200
Gly Arg Asn Asp Met Glu Leu Leu Arg Arg Thr Asn Asn Gly Arg Asp	
385 390 395 400	

atc aac cgc cac tac tac tcc acc gcc gaa atc gat gaa aac ctc gaa 1248
 Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser Thr Ala Glu Ile Asp Glu Asn Leu Glu
 405 410 415

cgc ccg gtg gtc aag gcc ctg aac gcc ctg gcc aag ttc cgc aac gag 1296
 Arg Pro Val Val Lys Ala Leu Asn Ala Leu Ala Lys Phe Arg Asn Glu
 420 425 430

ctg tct gca ttc gat ggc gag ttc agc tac gag gtc gat ggc gac acg 1344
 Leu Ser Ala Phe Asp Gly Glu Phe Ser Tyr Glu Val Asp Gly Asp Thr
 435 440 445

tcc atc acc ttc cgc tgg acc gcc gcc gac ggc gcg tcc acg gcc gcc 1392
 Ser Ile Thr Phe Arg Trp Thr Ala Ala Asp Gly Ala Ser Thr Ala Ala
 450 455 460

ctc acc ttc gag ccc gga cgc ggc ctc ggc aca gac aac gcc acc ccg 1440
 Leu Thr Phe Glu Pro Gly Arg Gly Leu Gly Thr Asp Asn Ala Thr Pro
 465 470 475 480

gtc gcc agc ctt gcc tgg agc gat gcc gcc ggc gac cac gaa acc cac 1488
 Val Ala Ser Leu Ala Trp Ser Asp Ala Ala Gly Asp His Glu Thr His
 485 490 495

gat ctg ctc gcc aac ccg ccg att gcc gat atc gac 1524
 Asp Leu Leu Ala Asn Pro Pro Ile Ala Asp Ile Asp
 500 505

<210> 12

<211> 508

<212> PRT

<213> Bifidobacterium longum

<400> 12

Met Lys Asn Lys Val Gln Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Arg Leu Gly Asp
 1 5 10 15

Gly Thr Leu Ser Ser Met Thr Asp Ile Leu Arg Thr Arg Phe Asp Gly
 20 25 30

Val Tyr Asp Gly Val His Ile Leu Pro Phe Phe Thr Pro Phe Asp Gly
 35 40 45

Ala Asp Ala Gly Phe Asp Pro Ile Asp His Thr Lys Val Asp Glu Arg

50

55

60

Leu Gly Ser Trp Asp Asp Val Ala Glu Leu Ser Lys Thr His Asn Ile
65 70 75 80

Met Val Asp Ala Ile Val Asn His Met Ser Trp Glu Ser Lys Gln Phe
85 90 95

Gln Asp Val Leu Glu Lys Gly Glu Glu Ser Glu Tyr Tyr Pro Met Phe
100 105 110

Leu Thr Met Ser Ser Val Phe Pro Asn Gly Ala Thr Glu Glu Asp Leu
115 120 125

Ala Gly Ile Tyr Arg Pro Arg Pro Gly Leu Pro Phe Thr His Tyr Lys
130 135 140

Phe Ala Gly Lys Thr Arg Leu Val Trp Val Ser Phe Thr Pro Gln Gln
145 150 155 160

Val Asp Ile Asp Thr Asp Ser Asp Glu Gly Trp Glu Tyr Leu Met Ser
165 170 175

Ile Phe Asp Gln Met Ala Ala Ser His Val Ser Tyr Ile Arg Leu Asp
180 185 190

Ala Val Gly Tyr Gly Ala Lys Glu Ala Ser Thr Ser Cys Phe Met Thr
195 200 205

Pro Lys Thr Phe Lys Leu Ile Ser Arg Leu Arg Glu Glu Gly Val Lys
210 215 220

Arg Gly Leu Glu Ile Leu Ile Glu Val His Ser Tyr Tyr Lys Lys Gln
225 230 235 240

Val Glu Ile Ala Ser Lys Val Asp Arg Val Tyr Asp Phe Ala Leu Pro
245 250 255

Pro Leu Leu Leu His Ser Leu Phe Thr Gly His Val Glu Pro Val Ala
260 265 270

His Trp Thr Glu Ile Arg Pro Asn Asn Ala Val Thr Val Leu Asp Thr
275 280 285

His Asp Gly Ile Gly Val Ile Asp Ile Gly Ser Asp Gln Leu Asp Arg
290 295 300

Ser Leu Lys Gly Leu Val Pro Asp Glu Asp Val Asp Asn Leu Val Asn
305 310 315 320

Thr Ile His Ala Asn Thr His Gly Glu Ser Gln Ala Ala Thr Gly Ala
325 330 335

Ala Ala Ser Asn Leu Asp Leu Tyr Gln Val Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser
340 345 350

Ala Leu Gly Cys Asn Asp Gln His Tyr Leu Ala Ala Arg Ala Val Gln
355 360 365

Phe Phe Leu Pro Gly Val Pro Gln Val Tyr Tyr Val Gly Ala Leu Ala
370 375 380

Gly Arg Asn Asp Met Glu Leu Leu Arg Arg Thr Asn Asn Gly Arg Asp
385 390 395 400

Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser Thr Ala Glu Ile Asp Glu Asn Leu Glu
405 410 415

Arg Pro Val Val Lys Ala Leu Asn Ala Leu Ala Lys Phe Arg Asn Glu
420 425 430

Leu Ser Ala Phe Asp Gly Glu Phe Ser Tyr Glu Val Asp Gly Asp Thr
435 440 445

Ser Ile Thr Phe Arg Trp Thr Ala Ala Asp Gly Ala Ser Thr Ala Ala

450

455

460

Leu Thr Phe Glu Pro Gly Arg Gly Leu Gly Thr Asp Asn Ala Thr Pro
 465 470 475 480

Val Ala Ser Leu Ala Trp Ser Asp Ala Ala Gly Asp His Glu Thr His
 485 490 495

Asp Leu Leu Ala Asn Pro Pro Ile Ala Asp Ile Asp
 500 505

<210> 13
 <211> 1464
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium vitis

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1464)

<400> 13
 atg aaa aac agt gta caa ctt atc acc tac gtc gac cgg tta agc gga 48
 Met Lys Asn Ser Val Gln Leu Ile Thr Tyr Val Asp Arg Leu Ser Gly
 1 5 10 15
 ggt ggt ttc ccc gag ttg aga gct ttg ctc gac ggg agg cta caa ggc 96
 Gly Gly Phe Pro Glu Leu Arg Ala Leu Leu Asp Gly Arg Leu Gln Gly
 20 25 30
 ctg ttc ggc ggc gtc cat gcc ttg cct ttc ttc aac ccg atc gac ggc 144
 Leu Phe Gly Gly Val His Ala Leu Pro Phe Phe Asn Pro Ile Asp Gly
 35 40 45
 gct gat gcc ggg ttc gat ccc acc gat cac acg att gtc gat cct cgc 192
 Ala Asp Ala Gly Phe Asp Pro Thr Asp His Thr Ile Val Asp Pro Arg
 50 55 60
 ctc ggt agc tgg gat gat gtt cgc gcc ctc gcc ggc tcc gtg gag atc 240
 Leu Gly Ser Trp Asp Asp Val Arg Ala Leu Ala Gly Ser Val Glu Ile
 65 70 75 80
 atg gcc gat ctc att gtc aac cat gtc tcg gcg caa tcg agc tgg ttc 288
 Met Ala Asp Leu Ile Val Asn His Val Ser Ala Gln Ser Ser Trp Phe
 85 90 95

cag gac ttc atc gca aaa gga tct gat tca gaa ttc gca gac atg ttc 336
 Gln Asp Phe Ile Ala Lys Gly Ser Asp Ser Glu Phe Ala Asp Met Phe
 100 105 110

atg aca ttt ggc aag gcc ttt ccc cgt ggt gcc agc gag cag gat ctc 384
 Met Thr Phe Gly Lys Ala Phe Pro Arg Gly Ala Ser Glu Gln Asp Leu
 115 120 125

ctg aat atc tat cgg cca cgc ctg ggc tgc cgt ttt caa agg cca cgc 432
 Leu Asn Ile Tyr Arg Pro Arg Leu Gly Cys Arg Phe Gln Arg Pro Arg
 130 135 140

ttg cag att ggc agc cag cgg atg ctg tgg acc aca ttc acc ccc caa 480
 Leu Gln Ile Gly Ser Gln Arg Met Leu Trp Thr Thr Phe Thr Pro Gln
 145 150 155 160

cag atc gac atc gat gtc cac agt gcc cat ggc gct tta tac ctg gag 528
 Gln Ile Asp Ile Asp Val His Ser Ala His Gly Ala Leu Tyr Leu Glu
 165 170 175

act atc ctc gat cgc ttt gct gaa gcc aac gtg acg gca atc cgc ctc 576
 Thr Ile Leu Asp Arg Phe Ala Glu Ala Asn Val Thr Ala Ile Arg Leu
 180 185 190

gat gcc gcc ggc tac gcg atc aag aag gcc gga acc agt tgc ttc atg 624
 Asp Ala Ala Gly Tyr Ala Ile Lys Lys Ala Gly Thr Ser Cys Phe Met
 195 200 205

att gat gag acc tat gcc ttc ctt gcc aag ctg gcc gag aag gca cgg 672
 Ile Asp Glu Thr Tyr Ala Phe Leu Ala Lys Leu Ala Glu Lys Ala Arg
 210 215 220

gat cgc ggg atg gag gtt ctt gtc gaa att cac agc tac tat cgt gac 720
 Asp Arg Gly Met Glu Val Leu Val Glu Ile His Ser Tyr Tyr Arg Asp
 225 230 235 240

cag atc gaa atc gcc agc aag gtt gac cgc gta tac gat ttt gcg ctg 768
 Gln Ile Glu Ile Ala Ser Lys Val Asp Arg Val Tyr Asp Phe Ala Leu
 245 250 255

ccg cca ctg ata ttg cat tca ttg ttc acg ggc gat gcg aca gcg ctg 816
 Pro Pro Leu Ile Leu His Ser Leu Phe Thr Gly Asp Ala Thr Ala Leu
 260 265 270

gcg cgt tgg ctg gag atc agc cct cac aac gca atc acc gtc ctc gac 864
 Ala Arg Trp Leu Glu Ile Ser Pro His Asn Ala Ile Thr Val Leu Asp
 275 280 285

act cac gac ggg atc ggc gtc atc gat gtc ggc gcg cac agt gat ggc 912
 Thr His Asp Gly Ile Gly Val Ile Asp Val Gly Ala His Ser Asp Gly

290	295	300	
cga ccc gga ctt ttg gaa ccg cag gca atc gac cat ctg gtc gag gag			960
Arg Pro Gly Leu Leu Glu Pro Gln Ala Ile Asp His Leu Val Glu Glu			
305	310	315	320
att cac agg cgc tca gag gga cag agc cgt ttg gca aca ggc gct gca			1008
Ile His Arg Arg Ser Glu Gly Gln Ser Arg Leu Ala Thr Gly Ala Ala			
	325	330	335
gcc tct aac ctg gac ctc tat cag gtg aac tgc acc tat tac gac gcg			1056
Ala Ser Asn Leu Asp Leu Tyr Gln Val Asn Cys Thr Tyr Tyr Asp Ala			
	340	345	350
ctc ggc cgt aac gac gac gac tac ctc atc gcc cgc gca atc cag ttt			1104
Leu Gly Arg Asn Asp Asp Asp Tyr Leu Ile Ala Arg Ala Ile Gln Phe			
	355	360	365
ttc gca ccc ggt atc ccg caa gtc tat tac gtc ggc ctc ctg ggc ggg			1152
Phe Ala Pro Gly Ile Pro Gln Val Tyr Tyr Val Gly Leu Leu Gly Gly			
	370	375	380
atc aat gac atg gaa ttg ctg gga aag acg ggc gtc ggg cgt gac atc			1200
Ile Asn Asp Met Glu Leu Leu Gly Lys Thr Gly Val Gly Arg Asp Ile			
	385	390	395
aat cgg cac ttt tac gaa gac cgg gaa att gat ctc gct ctt gaa tcg			1248
Asn Arg His Phe Tyr Glu Asp Arg Glu Ile Asp Leu Ala Leu Glu Ser			
	405	410	415
ccg ctc gtc aaa cga ctg tcg gac ttg atc cgc ttc cgt aac acc cat			1296
Pro Leu Val Lys Arg Leu Ser Asp Leu Ile Arg Phe Arg Asn Thr His			
	420	425	430
ccg gcc ttc aat gga tcg ttc gag gta gca acc gat gac acc gga agc			1344
Pro Ala Phe Asn Gly Ser Phe Glu Val Ala Thr Asp Asp Thr Gly Ser			
	435	440	445
ctt gtt tta agc tgg aat ctc aac acc gag ttt gct caa cta gta gtt			1392
Leu Val Leu Ser Trp Asn Leu Asn Thr Glu Phe Ala Gln Leu Val Val			
	450	455	460
tcg ttc tct caa ggc aag gca acg atc acg gct tca ggc tgc tac gat			1440
Ser Phe Ser Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Ser Gly Cys Tyr Asp			
	465	470	475
ttc aca ttc tca gga gcg atc gca			1464
Phe Thr Phe Ser Gly Ala Ile Ala			
	485		

<210> 14
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Agrobacterium vitis

<400> 14

Met Lys Asn Ser Val Gln Leu Ile Thr Tyr Val Asp Arg Leu Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Phe Pro Glu Leu Arg Ala Leu Leu Asp Gly Arg Leu Gln Gly
 20 25 30

Leu Phe Gly Gly Val His Ala Leu Pro Phe Phe Asn Pro Ile Asp Gly
 35 40 45

Ala Asp Ala Gly Phe Asp Pro Thr Asp His Thr Ile Val Asp Pro Arg
 50 55 60

Leu Gly Ser Trp Asp Asp Val Arg Ala Leu Ala Gly Ser Val Glu Ile
 65 70 75 80

Met Ala Asp Leu Ile Val Asn His Val Ser Ala Gln Ser Ser Trp Phe
 85 90 95

Gln Asp Phe Ile Ala Lys Gly Ser Asp Ser Glu Phe Ala Asp Met Phe
 100 105 110

Met Thr Phe Gly Lys Ala Phe Pro Arg Gly Ala Ser Glu Gln Asp Leu
 115 120 125

Leu Asn Ile Tyr Arg Pro Arg Leu Gly Cys Arg Phe Gln Arg Pro Arg
 130 135 140

Leu Gln Ile Gly Ser Gln Arg Met Leu Trp Thr Thr Phe Thr Pro Gln
 145 150 155 160

Gln Ile Asp Ile Asp Val His Ser Ala His Gly Ala Leu Tyr Leu Glu
 165 170 175

Thr Ile Leu Asp Arg Phe Ala Glu Ala Asn Val Thr Ala Ile Arg Leu
180 185 190

Asp Ala Ala Gly Tyr Ala Ile Lys Lys Ala Gly Thr Ser Cys Phe Met
195 200 205

Ile Asp Glu Thr Tyr Ala Phe Leu Ala Lys Leu Ala Glu Lys Ala Arg
210 215 220

Asp Arg Gly Met Glu Val Leu Val Glu Ile His Ser Tyr Tyr Arg Asp
225 230 235 240

Gln Ile Glu Ile Ala Ser Lys Val Asp Arg Val Tyr Asp Phe Ala Leu
245 250 255

Pro Pro Leu Ile Leu His Ser Leu Phe Thr Gly Asp Ala Thr Ala Leu
260 265 270

Ala Arg Trp Leu Glu Ile Ser Pro His Asn Ala Ile Thr Val Leu Asp
275 280 285

Thr His Asp Gly Ile Gly Val Ile Asp Val Gly Ala His Ser Asp Gly
290 295 300

Arg Pro Gly Leu Leu Glu Pro Gln Ala Ile Asp His Leu Val Glu Glu
305 310 315 320

Ile His Arg Arg Ser Glu Gly Gln Ser Arg Leu Ala Thr Gly Ala Ala
325 330 335

Ala Ser Asn Leu Asp Leu Tyr Gln Val Asn Cys Thr Tyr Tyr Asp Ala
340 345 350

Leu Gly Arg Asn Asp Asp Asp Tyr Leu Ile Ala Arg Ala Ile Gln Phe
355 360 365

Phe Ala Pro Gly Ile Pro Gln Val Tyr Tyr Val Gly Leu Leu Gly Gly
370 375 380

Ile Asn Asp Met Glu Leu Leu Gly Lys Thr Gly Val Gly Arg Asp Ile
385 390 395 400

Asn Arg His Phe Tyr Glu Asp Arg Glu Ile Asp Leu Ala Leu Glu Ser
405 410 415

Pro Leu Val Lys Arg Leu Ser Asp Leu Ile Arg Phe Arg Asn Thr His
420 425 430

Pro Ala Phe Asn Gly Ser Phe Glu Val Ala Thr Asp Asp Thr Gly Ser
435 440 445

Leu Val Leu Ser Trp Asn Leu Asn Thr Glu Phe Ala Gln Leu Val Val
450 455 460

Ser Phe Ser Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Ser Gly Cys Tyr Asp
465 470 475 480

Phe Thr Phe Ser Gly Ala Ile Ala
485

<210> 15
<211> 1491
<212> DNA
<213> Pseudomonas saccharophila

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1491)

<400> 15
atg aag aac caa gtc caa ctc atc acc tac gtc gat cgc ctt ggc ggc 48
Met Lys Asn Gln Val Gln Leu Ile Thr Tyr Val Asp Arg Leu Gly Gly
1 5 10 15

cag cgc gac ggc gcc gac ctg gct cgg ctg aag aaa ttg ctc tgc gag 96
Gln Arg Asp Gly Ala Asp Leu Ala Arg Leu Lys Lys Leu Leu Cys Glu
20 25 30

cct ggc cag ccg ctg gcg gat gtg ttc ggc ggc gtg cat ctg ctg ccc 144
 Pro Gly Gln Pro Leu Ala Asp Val Phe Gly Gly Val His Leu Leu Pro
 35 40 45

ttc ttc cat gcc atc gac ggt gcc gat gcc ggc ttc gac ccc ata gac 192
 Phe Phe His Ala Ile Asp Gly Ala Asp Ala Gly Phe Asp Pro Ile Asp
 50 55 60

cac acc ctg gtc gat ccg cgc ctg ggc gac tgg tcc gac atc aag gcc 240
 His Thr Leu Val Asp Pro Arg Leu Gly Asp Trp Ser Asp Ile Lys Ala
 65 70 75 80

ctg acc gag ggc ctc gaa gtg atg ggc gac gtc atc gtc aac cac atg 288
 Leu Thr Glu Gly Leu Glu Val Met Gly Asp Val Ile Val Asn His Met
 85 90 95

tcc agc gag tcg ccg cag ttc cag gac ttc tcc gcc aag ggc cgt gaa 336
 Ser Ser Glu Ser Pro Gln Phe Gln Asp Phe Ser Ala Lys Gly Arg Glu
 100 105 110

tcg gcc tac gac ggt ctg ttc ctg acg ttg gac gcg gta ttc ccg aac 384
 Ser Ala Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Thr Leu Asp Ala Val Phe Pro Asn
 115 120 125

ggc gcg acc gag cgg gac ctg ctc act gtc tac cgc ccc cgc ccc ggg 432
 Gly Ala Thr Glu Arg Asp Leu Leu Thr Val Tyr Arg Pro Arg Pro Gly
 130 135 140

cct gcc gct gag cta tgc gac gct gaa gaa cgg cga gcg cgc atc ctg 480
 Pro Ala Ala Glu Leu Cys Asp Ala Glu Glu Arg Arg Ala Arg Ile Leu
 145 150 155 160

tgg acc acc ttc acg gcg gcg cag atc gac atc gcc gtc cac cac ccg 528
 Trp Thr Thr Phe Thr Ala Ala Gln Ile Asp Ile Ala Val His His Pro
 165 170 175

cag ggg cgc gcc tac ctg gag agc atc ctg cag acc ttt gcc gcc aac 576
 Gln Gly Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Ile Leu Gln Thr Phe Ala Ala Asn
 180 185 190

ggc atc cgc atg gtg agg ctg gat gcg gtc gcc tac gcg atc aag aag 624
 Gly Ile Arg Met Val Arg Leu Asp Ala Val Gly Tyr Ala Ile Lys Lys
 195 200 205

gcc ggt gcg agc tgc ttc atg atg cct gag acg ttc gcc ttc atc gcc 672
 Ala Gly Ala Ser Cys Phe Met Met Pro Glu Thr Phe Gly Phe Ile Ala
 210 215 220

gag ttc gcg cag gca gcc agg gcg ctg ggc atc gag gtg ctg gtc gag 720

出証特 2004-3099148

atc gag ctg att cgc ctg cgc aac cgt cat ccg gcc ttc ggc ggc gtc 1344
 Ile Glu Leu Ile Arg Leu Arg Asn Arg His Pro Ala Phe Gly Gly Val
 435 440 445

ttc agc gtc gag gcc ggc ggc gat gac gaa ctg cat ctg cgc tgg cag 1392
 Phe Ser Val Glu Ala Gly Gly Asp Asp Glu Leu His Leu Arg Trp Gln
 450 455 460

cag ggc ggc gac tgg ggc ccg ctg cgc gtg aac ttc gcc agc ctc gat 1440
 Gln Gly Gly Asp Trp Gly Pro Leu Arg Val Asn Phe Ala Ser Leu Asp
 465 470 475 480

cac gag ctg agc tgc agc cga cgg cgg cgc gac cga gcc ttc gcc ttc 1488
 His Glu Leu Ser Cys Ser Arg Arg Arg Asp Arg Ala Phe Ala Phe
 485 490 495

agt 1491
 Ser

<210> 16
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas saccharophila

<400> 16

Met Lys Asn Gln Val Gln Leu Ile Thr Tyr Val Asp Arg Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Asp Gly Ala Asp Leu Ala Arg Leu Lys Lys Leu Leu Cys Glu
 20 25 30

Pro Gly Gln Pro Leu Ala Asp Val Phe Gly Gly Val His Leu Leu Pro
 35 40 45

Phe Phe His Ala Ile Asp Gly Ala Asp Ala Gly Phe Asp Pro Ile Asp
 50 55 60

His Thr Leu Val Asp Pro Arg Leu Gly Asp Trp Ser Asp Ile Lys Ala
 65 70 75 80

Leu Thr Glu Gly Leu Glu Val Met Gly Asp Val Ile Val Asn His Met

85

90

95

Ser Ser Glu Ser Pro Gln Phe Gln Asp Phe Ser Ala Lys Gly Arg Glu
100 105 110

Ser Ala Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Thr Leu Asp Ala Val Phe Pro Asn
115 120 125

Gly Ala Thr Glu Arg Asp Leu Leu Thr Val Tyr Arg Pro Arg Pro Gly
130 135 140

Pro Ala Ala Glu Leu Cys Asp Ala Glu Glu Arg Arg Ala Arg Ile Leu
145 150 155 160

Trp Thr Thr Phe Thr Ala Ala Gln Ile Asp Ile Ala Val His His Pro
165 170 175

Gln Gly Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Ile Leu Gln Thr Phe Ala Ala Asn
180 185 190

Gly Ile Arg Met Val Arg Leu Asp Ala Val Gly Tyr Ala Ile Lys Lys
195 200 205

Ala Gly Ala Ser Cys Phe Met Met Pro Glu Thr Phe Gly Phe Ile Ala
210 215 220

Glu Phe Ala Gln Ala Ala Arg Ala Leu Gly Ile Glu Val Leu Val Glu
225 230 235 240

Ile His Ala Tyr Tyr Gln Arg Gln Ile Glu Ile Ala Ser Gln Val Asp
245 250 255

Trp Val Tyr Asp Phe Ala Leu Pro Pro Leu Val Leu His Ala Phe Glu
260 265 270

Phe Lys Thr Ala Gly Ala Leu Lys Arg Trp Ile Ala Val Arg Pro Thr
275 280 285

Asn Ala Leu Thr Val Leu Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Ile Ile Asp
290 295 300

Ile Gly Ala Asp Ala Ser Asp Arg Ala Ala His Pro Gly Leu Val Pro
305 310 315 320

Pro Glu Glu Leu Asp Ala Leu Val Glu Arg Ile His Ala Ala Ser Gln
325 330 335

Gly Gln Ser Arg Lys Pro Thr Gly Ala Ala Ala Ser Asn Leu Asp Leu
340 345 350

Tyr Gln Val Asn Cys Ser Phe Phe Asp Ala Met Gly Arg Asn Glu Thr
355 360 365

Ala Tyr Leu Leu Ala Arg Ala Ile Gln Phe Phe Leu Pro Gly Val Pro
370 375 380

Gln Val Tyr Tyr Val Gly Leu Leu Ala Gly His Asn Asp Met Glu Leu
385 390 395 400

Leu Ala Arg Thr Gln Val Gly Arg Asp Ile Asn Arg His Tyr Tyr Asp
405 410 415

Ala Ala Glu Ile Ala Ser Asp Cys Glu Arg Pro Val Val Arg Arg Leu
420 425 430

Ile Glu Leu Ile Arg Leu Arg Asn Arg His Pro Ala Phe Gly Gly Val
435 440 445

Phe Ser Val Glu Ala Gly Gly Asp Asp Glu Leu His Leu Arg Trp Gln
450 455 460

Gln Gly Gly Asp Trp Gly Pro Leu Arg Val Asn Phe Ala Ser Leu Asp
465 470 475 480

His Glu Leu Ser Cys Ser Arg Arg Arg Arg Asp Arg Ala Phe Ala Phe

485

490

495

Ser

<210> 17
 <211> 1677
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1677)

<400> 17
 atg aaa cag aaa att acg gat tac ctg gac gaa atc tac ggt gga aca 48
 Met Lys Gln Lys Ile Thr Asp Tyr Leu Asp Glu Ile Tyr Gly Gly Thr
 1 5 10 15

ttt acc gca act cat tta cag aaa ctt gta acg cgt ctt gag agt gcg 96
 Phe Thr Ala Thr His Leu Gln Lys Leu Val Thr Arg Leu Glu Ser Ala
 20 25 30

aaa cga tta att aca cag cga cgt aaa aaa cac tgg gat gaa agt gat 144
 Lys Arg Leu Ile Thr Gln Arg Arg Lys Lys His Trp Asp Glu Ser Asp
 35 40 45

gtc gtg tta att acc tat gcc gat caa ttt cac agc aat gat tta aaa 192
 Val Val Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Gln Phe His Ser Asn Asp Leu Lys
 50 55 60

cca tta ccc aca ttt aat cag ttt tac cat caa tgg ctg caa agc att 240
 Pro Leu Pro Thr Phe Asn Gln Phe Tyr His Gln Trp Leu Gln Ser Ile
 65 70 75 80

ttt tca cat gtt cat ttg ttg ccg ttt tat cca tgg tca tct gat gat 288
 Phe Ser His Val His Leu Leu Pro Phe Tyr Pro Trp Ser Ser Asp Asp
 85 90 95

ggc ttt tcg gta att gat tat cat cag gtc gcc agt gaa gcg ggg gag 336
 Gly Phe Ser Val Ile Asp Tyr His Gln Val Ala Ser Glu Ala Gly Glu
 100 105 110

tgg cag gat att cag caa ctc ggt gaa tgc agt cat tta atg ttt gat 384
 Trp Gln Asp Ile Gln Gln Leu Gly Glu Cys Ser His Leu Met Phe Asp
 115 120 125

ttt gtc tgc aac cat atg tcg gca aaa agt gaa tgg ttt aaa aac tat 432
 Phe Val Cys Asn His Met Ser Ala Lys Ser Glu Trp Phe Lys Asn Tyr
 130 135 140

tta caa cag cat cca ggt ttt gaa gat ttt ttt att gcc gtt gac ccg 480
 Leu Gln Gln His Pro Gly Phe Glu Asp Phe Phe Ile Ala Val Asp Pro
 145 150 155 160

caa acc gat ctc agc gcc gtc act cgc ccg cgt gcg tta ccg tta tta 528
 Gln Thr Asp Leu Ser Ala Val Thr Arg Pro Arg Ala Leu Pro Leu Leu
 165 170 175

acg cca ttc cag atg cgc gat cat tca acg cgc cat tta tgg acc acc 576
 Thr Pro Phe Gln Met Arg Asp His Ser Thr Arg His Leu Trp Thr Thr
 180 185 190

ttt agt gac gat caa att gac ctg aat tac cgt agc cct gaa gtg ttg 624
 Phe Ser Asp Asp Gln Ile Asp Leu Asn Tyr Arg Ser Pro Glu Val Leu
 195 200 205

ctg gcg atg gtg gat gtt tta ctc tgt tac ctt gcg aaa ggt gct gag 672
 Leu Ala Met Val Asp Val Leu Leu Cys Tyr Leu Ala Lys Gly Ala Glu
 210 215 220

tat gtc cgc ctg gat gcc gtt ggc ttt atg tgg aaa gag ccg gga aca 720
 Tyr Val Arg Leu Asp Ala Val Gly Phe Met Trp Lys Glu Pro Gly Thr
 225 230 235 240

agc tgc atc cat ctg gaa aaa aca cat ctg att atc aaa ctg tta cgg 768
 Ser Cys Ile His Leu Glu Lys Thr His Leu Ile Ile Lys Leu Leu Arg
 245 250 255

tcg att att gat aac gtt gcg cca ggt aca gtg atc att acc gag acc 816
 Ser Ile Ile Asp Asn Val Ala Pro Gly Thr Val Ile Ile Thr Glu Thr
 260 265 270

aat gtt ccg cat aaa gac aac att gct tac ttt ggc gca ggc gat gac 864
 Asn Val Pro His Lys Asp Asn Ile Ala Tyr Phe Gly Ala Gly Asp Asp
 275 280 285

gaa gca cat atg gtg tac cag ttc tcg ctg ccg cca ctg gtg ctg cat 912
 Glu Ala His Met Val Tyr Gln Phe Ser Leu Pro Pro Leu Val Leu His
 290 295 300

gcg gtg caa aaa cag aac gtt gag gcg ctt tgt gcg tgg gcg caa aac 960
 Ala Val Gln Lys Gln Asn Val Glu Ala Leu Cys Ala Trp Ala Gln Asn
 305 310 315 320

ctg aca cta cct tcc agc aac acc acc tgg ttt aac ttc ctc gcc tct 1008
 Leu Thr Leu Pro Ser Ser Asn Thr Thr Trp Phe Asn Phe Leu Ala Ser

325	330	335	
cac gat ggc atc ggg cta aac ccg cta cgg ggc ttg ttg cct gaa agc			1056
His Asp Gly Ile Gly Leu Asn Pro Leu Arg Gly Leu Leu Pro Glu Ser			
340	345	350	
gaa ata tta gag ctg gtc gag gcg tta cag cag gaa ggt gca tta gta			1104
Glu Ile Leu Glu Leu Val Glu Ala Leu Gln Gln Glu Gly Ala Leu Val			
355	360	365	
aac tgg aaa aat aat ccc gac ggt aca cgc agt ccg tat gaa ata aat			1152
Asn Trp Lys Asn Asn Pro Asp Gly Thr Arg Ser Pro Tyr Glu Ile Asn			
370	375	380	
gtg acc tat atg gat gcg tta agc cgc cgt gag agt agc gat gaa gaa			1200
Val Thr Tyr Met Asp Ala Leu Ser Arg Arg Glu Ser Ser Asp Glu Glu			
385	390	395	400
cgt tgc gcc agg ttt atc ctt gcc cat gcg att ttg tta agt ttc ccc			1248
Arg Cys Ala Arg Phe Ile Leu Ala His Ala Ile Leu Leu Ser Phe Pro			
405	410	415	
ggt gtg cca gcg ata tat att caa agt att ctt ggc tcg cgt aat gat			1296
Gly Val Pro Ala Ile Tyr Ile Gln Ser Ile Leu Gly Ser Arg Asn Asp			
420	425	430	
tac gca ggt gtc gaa aaa ctc gga tat aac cgt gcg att aac cgt aaa			1344
Tyr Ala Gly Val Glu Lys Leu Gly Tyr Asn Arg Ala Ile Asn Arg Lys			
435	440	445	
aaa tat cac agt aaa gag ata acc cga gaa ctg aac gat gaa gct aca			1392
Lys Tyr His Ser Lys Glu Ile Thr Arg Glu Leu Asn Asp Glu Ala Thr			
450	455	460	
tta agg cat gcg gta tat cat gag ttg tcg cgt tta att aca ctt cgt			1440
Leu Arg His Ala Val Tyr His Glu Leu Ser Arg Leu Ile Thr Leu Arg			
465	470	475	480
cgc agc cat aac gag ttt cat ccg gat aat aat ttt acc att gat acg			1488
Arg Ser His Asn Glu Phe His Pro Asp Asn Asn Phe Thr Ile Asp Thr			
485	490	495	
att aat tca tcc gta atg cgt att cca aga agt aac gct gat ggt aat			1536
Ile Asn Ser Ser Val Met Arg Ile Pro Arg Ser Asn Ala Asp Gly Asn			
500	505	510	
tgt ctg act gga ttg ttt aat gtc agt aaa aat att cag cat gta aat			1584
Cys Leu Thr Gly Leu Phe Asn Val Ser Lys Asn Ile Gln His Val Asn			
515	520	525	

att act aat ctg cat ggt cgg gat ctg att agt gaa gtt gat ata ttg 1632
 Ile Thr Asn Leu His Gly Arg Asp Leu Ile Ser Glu Val Asp Ile Leu
 530 535 540

ggt aat gaa ata acg ctg cgc ccc tgg cag gtt atg tgg att aaa 1677
 Gly Asn Glu Ile Thr Leu Arg Pro Trp Gln Val Met Trp Ile Lys
 545 550 555

<210> 18
 <211> 559
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 18

Met Lys Gln Lys Ile Thr Asp Tyr Leu Asp Glu Ile Tyr Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Phe Thr Ala Thr His Leu Gln Lys Leu Val Thr Arg Leu Glu Ser Ala
 20 25 30

Lys Arg Leu Ile Thr Gln Arg Arg Lys Lys His Trp Asp Glu Ser Asp
 35 40 45

Val Val Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Gln Phe His Ser Asn Asp Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Pro Thr Phe Asn Gln Phe Tyr His Gln Trp Leu Gln Ser Ile
 65 70 75 80

Phe Ser His Val His Leu Leu Pro Phe Tyr Pro Trp Ser Ser Asp Asp
 85 90 95

Gly Phe Ser Val Ile Asp Tyr His Gln Val Ala Ser Glu Ala Gly Glu
 100 105 110

Trp Gln Asp Ile Gln Gln Leu Gly Glu Cys Ser His Leu Met Phe Asp
 115 120 125

Phe Val Cys Asn His Met Ser Ala Lys Ser Glu Trp Phe Lys Asn Tyr
 130 135 140

Leu Gln Gln His Pro Gly Phe Glu Asp Phe Phe Ile Ala Val Asp Pro
145 150 155 160

Gln Thr Asp Leu Ser Ala Val Thr Arg Pro Arg Ala Leu Pro Leu Leu
165 170 175

Thr Pro Phe Gln Met Arg Asp His Ser Thr Arg His Leu Trp Thr Thr
180 185 190

Phe Ser Asp Asp Gln Ile Asp Leu Asn Tyr Arg Ser Pro Glu Val Leu
195 200 205

Leu Ala Met Val Asp Val Leu Leu Cys Tyr Leu Ala Lys Gly Ala Glu
210 215 220

Tyr Val Arg Leu Asp Ala Val Gly Phe Met Trp Lys Glu Pro Gly Thr
225 230 235 240

Ser Cys Ile His Leu Glu Lys Thr His Leu Ile Ile Lys Leu Leu Arg
245 250 255

Ser Ile Ile Asp Asn Val Ala Pro Gly Thr Val Ile Ile Thr Glu Thr
260 265 270

Asn Val Pro His Lys Asp Asn Ile Ala Tyr Phe Gly Ala Gly Asp Asp
275 280 285

Glu Ala His Met Val Tyr Gln Phe Ser Leu Pro Pro Leu Val Leu His
290 295 300

Ala Val Gln Lys Gln Asn Val Glu Ala Leu Cys Ala Trp Ala Gln Asn
305 310 315 320

Leu Thr Leu Pro Ser Ser Asn Thr Thr Trp Phe Asn Phe Leu Ala Ser
325 330 335

His Asp Gly Ile Gly Leu Asn Pro Leu Arg Gly Leu Leu Pro Glu Ser
340 345 350

Glu Ile Leu Glu Leu Val Glu Ala Leu Gln Gln Glu Gly Ala Leu Val
355 360 365

Asn Trp Lys Asn Asn Pro Asp Gly Thr Arg Ser Pro Tyr Glu Ile Asn
370 375 380

Val Thr Tyr Met Asp Ala Leu Ser Arg Arg Glu Ser Ser Asp Glu Glu
385 390 395 400

Arg Cys Ala Arg Phe Ile Leu Ala His Ala Ile Leu Leu Ser Phe Pro
405 410 415

Gly Val Pro Ala Ile Tyr Ile Gln Ser Ile Leu Gly Ser Arg Asn Asp
420 425 430

Tyr Ala Gly Val Glu Lys Leu Gly Tyr Asn Arg Ala Ile Asn Arg Lys
435 440 445

Lys Tyr His Ser Lys Glu Ile Thr Arg Glu Leu Asn Asp Glu Ala Thr
450 455 460

Leu Arg His Ala Val Tyr His Glu Leu Ser Arg Leu Ile Thr Leu Arg
465 470 475 480

Arg Ser His Asn Glu Phe His Pro Asp Asn Asn Phe Thr Ile Asp Thr
485 490 495

Ile Asn Ser Ser Val Met Arg Ile Pro Arg Ser Asn Ala Asp Gly Asn
500 505 510

Cys Leu Thr Gly Leu Phe Asn Val Ser Lys Asn Ile Gln His Val Asn
515 520 525

Ile Thr Asn Leu His Gly Arg Asp Leu Ile Ser Glu Val Asp Ile Leu
530 535 540

Gly Asn Glu Ile Thr Leu Arg Pro Trp Gln Val Met Trp Ile Lys
 545 550 555

<210> 19
 <211> 1698
 <212> DNA
 <213> *Listeria innocua*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1698)

<400> 19
 atg acg aat tta aga aaa cga ctt tcg cgg tta tat tct gaa gat gta 48
 Met Thr Asn Leu Arg Lys Arg Leu Ser Arg Leu Tyr Ser Glu Asp Val
 1 5 10 15
 gtt gag agt tta gca acg aga att gaa gcc cgg gta aac caa acg aaa 96
 Val Glu Ser Leu Ala Thr Arg Ile Glu Ala Arg Val Asn Gln Thr Lys
 20 25 30
 caa aga aag tta gta cga aaa gac aaa tgg gac gag aaa gat att gtt 144
 Gln Arg Lys Leu Val Arg Lys Asp Lys Trp Asp Glu Lys Asp Ile Val
 35 40 45
 tta att aca tat gga gac caa ttt aaa gag gaa tcc aaa aaa act tta 192
 Leu Ile Thr Tyr Gly Asp Gln Phe Lys Glu Glu Ser Lys Lys Thr Leu
 50 55 60
 cca acc ttt aag aaa atg tat gat cgt tat tta aaa tcg act ttt gag 240
 Pro Thr Phe Lys Lys Met Tyr Asp Arg Tyr Leu Lys Ser Thr Phe Glu
 65 70 75 80
 gta gta cat ttc cta cct ttc tat cct tat tcc tcg gat gat ggg ttt 288
 Val Val His Phe Leu Pro Phe Tyr Pro Tyr Ser Ser Asp Asp Gly Phe
 85 90 95
 tcg gtt att gat tac aaa gcg gtt aat ccg gag ctt ggc gat tgg gaa 336
 Ser Val Ile Asp Tyr Lys Ala Val Asn Pro Glu Leu Gly Asp Trp Glu
 100 105 110
 gat att aag gaa atg gaa cag tcg gcg cga ttg atg ttt gat ttt gtt 384
 Asp Ile Lys Glu Met Glu Gln Ser Ala Arg Leu Met Phe Asp Phe Val
 115 120 125
 tgt aat cat atg tcg gcg aaa agt gag tgg ttt aag aga tat tta gcg 432

Cys Asn His Met Ser Ala Lys Ser Glu Trp Phe Lys Arg Tyr Leu Ala	
130 135 140	
ggc gat aag gaa ttt caa aac ttt ttc gtg gaa atg gat ccc gat act	480
Gly Asp Lys Glu Phe Gln Asn Phe Phe Val Glu Met Asp Pro Asp Thr	
145 150 155 160	
gac ctt agt tcg gtt aca aga cca cgt gca aca cca gtg ctc acg ccg	528
Asp Leu Ser Ser Val Thr Arg Pro Arg Ala Thr Pro Val Leu Thr Pro	
165 170 175	
ttt caa ttt gct tct ggt aaa gag ggt tat att tgg acg acg ttt agt	576
Phe Gln Phe Ala Ser Gly Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Thr Thr Phe Ser	
180 185 190	
gag gat cag att gat tta aac ttt gct tgt ccg gaa gtg ctt tac aag	624
Glu Asp Gln Ile Asp Leu Asn Phe Ala Cys Pro Glu Val Leu Tyr Lys	
195 200 205	
atg att gat gtt ttg atg ttc tat tta gaa gaa ggt gcg gaa tat gtg	672
Met Ile Asp Val Leu Met Phe Tyr Leu Glu Glu Gly Ala Glu Tyr Val	
210 215 220	
cga ctt gat gcg gtt ggc ttt atg tgg aaa gtg ccg gga acg agc tcg	720
Arg Leu Asp Ala Val Gly Phe Met Trp Lys Val Pro Gly Thr Ser Ser	
225 230 235 240	
att cac tta gat gaa acg cat gaa atc gtg aaa tta ttt aga gat tta	768
Ile His Leu Asp Glu Thr His Glu Ile Val Lys Leu Phe Arg Asp Leu	
245 250 255	
gta gat atg gca gct ccg ggg acg att att ata act gaa acc aac gtg	816
Val Asp Met Ala Ala Pro Gly Thr Ile Ile Ile Thr Glu Thr Asn Val	
260 265 270	
ccg cat gtt gat aat att agt tat ttt gga aat ggt gaa aag gaa gcg	864
Pro His Val Asp Asn Ile Ser Tyr Phe Gly Asn Gly Glu Lys Glu Ala	
275 280 285	
cat atg gtt tat caa ttc ccg ctt cca cca ctc gtg ctc cat gcg ata	912
His Met Val Tyr Gln Phe Pro Leu Pro Pro Leu Val Leu His Ala Ile	
290 295 300	
cat cac gga aat gcg gaa ttt ttg agc aat tgg gcg aag aat tta gag	960
His His Gly Asn Ala Glu Phe Leu Ser Asn Trp Ala Lys Asn Leu Glu	
305 310 315 320	
ctc cca gaa ggc aag cgt aca ttc ttt aat ttc ctt gct tca cat gat	1008
Leu Pro Glu Gly Lys Arg Thr Phe Phe Asn Phe Leu Ala Ser His Asp	
325 330 335	

gga att ggc tta aat cca gtg cgc gga att att cca gaa gcg gaa att Gly Ile Gly Leu Asn Pro Val Arg Gly Ile Ile Pro Glu Ala Glu Ile 340 345 350	1056
tta gca ttg gta gat gat ttg gaa aaa gaa gga gca ctc gtt tct tat Leu Ala Leu Val Asp Asp Leu Glu Lys Glu Gly Ala Leu Val Ser Tyr 355 360 365	1104
aaa caa aat cca gat ggt act aaa agt ccg tat gaa att aat gtg act Lys Gln Asn Pro Asp Gly Thr Lys Ser Pro Tyr Glu Ile Asn Val Thr 370 375 380	1152
tac atg gat gcg tta agt aaa caa gcg gat act gat gac ttg agg cta Tyr Met Asp Ala Leu Ser Lys Gln Ala Asp Thr Asp Asp Leu Arg Leu 385 390 395 400	1200
tcg aga ttt ctc gtc gct cat gca gta tta atg tct atc cca ggc gtt Ser Arg Phe Leu Val Ala His Ala Val Leu Met Ser Ile Pro Gly Val 405 410 415	1248
ccg gct gtt tat gtt caa agt att tta gga agt cgc aat gat tat tca Pro Ala Val Tyr Val Gln Ser Ile Leu Gly Ser Arg Asn Asp Tyr Ser 420 425 430	1296
ggc gta gaa aca acg ggg cat aat cgc tct att aat cga aaa aaa tac Gly Val Glu Thr Thr Gly His Asn Arg Ser Ile Asn Arg Lys Lys Tyr 435 440 445	1344
gac ttg gcg gaa att aca gca gag ttg aat cag gct gac tcc tta cga Asp Leu Ala Glu Ile Thr Ala Glu Leu Asn Gln Ala Asp Ser Leu Arg 450 455 460	1392
aaa gaa acc tat gat gcg cta acg aaa tta att agc aca cga aaa gcg Lys Glu Thr Tyr Asp Ala Leu Thr Lys Leu Ile Ser Thr Arg Lys Ala 465 470 475 480	1440
gaa tca ctt ttc cat cca gaa ata ccg atg gaa gtt tta gaa tct acg Glu Ser Leu Phe His Pro Glu Ile Pro Met Glu Val Leu Glu Ser Thr 485 490 495	1488
gcg gaa ttg ttt gtt gtt aaa cgt tca tcc gac gcg gaa tcg att ata Ala Glu Leu Phe Val Val Lys Arg Ser Ser Asp Ala Glu Ser Ile Ile 500 505 510	1536
ttg att cat aat tta tca gaa aaa gaa gtg agt tat tca cta gac agc Leu Ile His Asn Leu Ser Glu Lys Glu Val Ser Tyr Ser Leu Asp Ser 515 520 525	1584
ggt gtt tat aca aat ctt tat aag ggc tcc acg gta act ggg agc gat	1632

Gly Val Tyr Thr Asn Leu Tyr Lys Gly Ser Thr Val Thr Gly Ser Asp
530 535 540

tcc ata aag ctt aga ggc tat gaa ttc tgc tgg cta aaa acc aaa aat 1680
Ser Ile Lys Leu Arg Gly Tyr Glu Phe Cys Trp Leu Lys Thr Lys Asn
545 550 555 560

tac agg gag gaa caa aaa 1698
Tyr Arg Glu Glu Gln Lys
565

<210> 20
<211> 566
<212> PRT
<213> *Listeria innocua*

<400> 20

Met Thr Asn Leu Arg Lys Arg Leu Ser Arg Leu Tyr Ser Glu Asp Val
1 5 10 15

Val Glu Ser Leu Ala Thr Arg Ile Glu Ala Arg Val Asn Gln Thr Lys
20 25 30

Gln Arg Lys Leu Val Arg Lys Asp Lys Trp Asp Glu Lys Asp Ile Val
35 40 45

Leu Ile Thr Tyr Gly Asp Gln Phe Lys Glu Glu Ser Lys Lys Thr Leu
50 55 60

Pro Thr Phe Lys Lys Met Tyr Asp Arg Tyr Leu Lys Ser Thr Phe Glu
65 70 75 80

Val Val His Phe Leu Pro Phe Tyr Pro Tyr Ser Ser Asp Asp Gly Phe
85 90 95

Ser Val Ile Asp Tyr Lys Ala Val Asn Pro Glu Leu Gly Asp Trp Glu
100 105 110

Asp Ile Lys Glu Met Glu Gln Ser Ala Arg Leu Met Phe Asp Phe Val
115 120 125

Cys Asn His Met Ser Ala Lys Ser Glu Trp Phe Lys Arg Tyr Leu Ala
 130 135 140

Gly Asp Lys Glu Phe Gln Asn Phe Phe Val Glu Met Asp Pro Asp Thr
 145 150 155 160

Asp Leu Ser Ser Val Thr Arg Pro Arg Ala Thr Pro Val Leu Thr Pro
 165 170 175

Phe Gln Phe Ala Ser Gly Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Thr Thr Phe Ser
 180 185 190

Glu Asp Gln Ile Asp Leu Asn Phe Ala Cys Pro Glu Val Leu Tyr Lys
 195 200 205

Met Ile Asp Val Leu Met Phe Tyr Leu Glu Glu Gly Ala Glu Tyr Val
 210 215 220

Arg Leu Asp Ala Val Gly Phe Met Trp Lys Val Pro Gly Thr Ser Ser
 225 230 235 240

Ile His Leu Asp Glu Thr His Glu Ile Val Lys Leu Phe Arg Asp Leu
 245 250 255

Val Asp Met Ala Ala Pro Gly Thr Ile Ile Ile Thr Glu Thr Asn Val
 260 265 270

Pro His Val Asp Asn Ile Ser Tyr Phe Gly Asn Gly Glu Lys Glu Ala
 275 280 285

His Met Val Tyr Gln Phe Pro Leu Pro Pro Leu Val Leu His Ala Ile
 290 295 300

His His Gly Asn Ala Glu Phe Leu Ser Asn Trp Ala Lys Asn Leu Glu
 305 310 315 320

Leu Pro Glu Gly Lys Arg Thr Phe Phe Asn Phe Leu Ala Ser His Asp

325

330

335

Gly Ile Gly Leu Asn Pro Val Arg Gly Ile Ile Pro Glu Ala Glu Ile
340 345 350

Leu Ala Leu Val Asp Asp Leu Glu Lys Glu Gly Ala Leu Val Ser Tyr
355 360 365

Lys Gln Asn Pro Asp Gly Thr Lys Ser Pro Tyr Glu Ile Asn Val Thr
370 375 380

Tyr Met Asp Ala Leu Ser Lys Gln Ala Asp Thr Asp Asp Leu Arg Leu
385 390 395 400

Ser Arg Phe Leu Val Ala His Ala Val Leu Met Ser Ile Pro Gly Val
405 410 415

Pro Ala Val Tyr Val Gln Ser Ile Leu Gly Ser Arg Asn Asp Tyr Ser
420 425 430

Gly Val Glu Thr Thr Gly His Asn Arg Ser Ile Asn Arg Lys Lys Tyr
435 440 445

Asp Leu Ala Glu Ile Thr Ala Glu Leu Asn Gln Ala Asp Ser Leu Arg
450 455 460

Lys Glu Thr Tyr Asp Ala Leu Thr Lys Leu Ile Ser Thr Arg Lys Ala
465 470 475 480

Glu Ser Leu Phe His Pro Glu Ile Pro Met Glu Val Leu Glu Ser Thr
485 490 495

Ala Glu Leu Phe Val Val Lys Arg Ser Ser Asp Ala Glu Ser Ile Ile
500 505 510

Leu Ile His Asn Leu Ser Glu Lys Glu Val Ser Tyr Ser Leu Asp Ser
515 520 525

Gly Val Tyr Thr Asn Leu Tyr Lys Gly Ser Thr Val Thr Gly Ser Asp
 530 535 540

Ser Ile Lys Leu Arg Gly Tyr Glu Phe Cys Trp Leu Lys Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Tyr Arg Glu Glu Gln Lys
 565

<210> 21
 <211> 1443
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A mutant of Streptococcus mutans sucrose phyophorylase

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1443)

<400> 21
 atg cca att aca aat aaa aca atg ttg att act tac gca gac agt ttg 48
 Met Pro Ile Thr Asn Lys Thr Met Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Leu
 1 5 10 15
 ggt aaa aat ttg aaa gaa ttg aat gaa aat att gag aat tat ttt gga 96
 Gly Lys Asn Leu Lys Glu Leu Asn Glu Asn Ile Glu Asn Tyr Phe Gly
 20 25 30
 gat gct gtt ggc ggt gtc cat ttg ctg cca ttc ttt cct tcc tca ggt 144
 Asp Ala Val Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Ser Gly
 35 40 45
 gat cgt ggc ttt gca ccg att gat tac cat gaa gtt gac cct gct ttt 192
 Asp Arg Gly Phe Ala Pro Ile Asp Tyr His Glu Val Asp Pro Ala Phe
 50 55 60
 ggc gat tgg gat gat gtc aaa cgt ttg ggt gaa aaa cat tac ctc atg 240
 Gly Asp Trp Asp Asp Val Lys Arg Leu Gly Glu Lys His Tyr Leu Met
 65 70 75 80
 ttt gat ttc atg att aat cat att tcg cgt cag tct aaa tat tat aaa 288
 Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Gln Ser Lys Tyr Tyr Lys
 85 90 95

gat tac caa gaa aag cat gaa gca agt gct tat aaa gat cta ttt tta Asp Tyr Gln Glu Lys His Glu Ala Ser Ala Tyr Lys Asp Leu Phe Leu 100 105 110	336
aat tgg gat aaa ttt tgg cct aaa aat cgc ccg aca caa gaa gat ctg Asn Trp Asp Lys Phe Trp Pro Lys Asn Arg Pro Thr Gln Glu Asp Leu 115 120 125	384
gac ctg att tat aag cgt aag gat cga gca cct atg cag gaa atc cga Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Arg Ala Pro Met Gln Glu Ile Arg 130 135 140	432
ttt gca gat ggc agt gtt gaa cat ctc tgg agc act ttt ggg gag gaa Phe Ala Asp Gly Ser Val Glu His Leu Trp Ser Thr Phe Gly Glu Glu 145 150 155 160	480
cag att gat ctt gac gtg act aaa gaa gtg act atg gat ttt att cgc Gln Ile Asp Leu Asp Val Thr Lys Glu Val Thr Met Asp Phe Ile Arg 165 170 175	528
tct acc att gaa aat tta gca gcc aac ggc tgt gat ctc att cgt ttg Ser Thr Ile Glu Asn Leu Ala Ala Asn Gly Cys Asp Leu Ile Arg Leu 180 185 190	576
gat gcc ttt gct tat gct gtt aaa aag cta gat acg aat gat ttc ttt Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Leu Asp Thr Asn Asp Phe Phe 195 200 205	624
gtt gaa cct gaa atc tgg act ctg cta gat aaa gtt cgt gat ata gct Val Glu Pro Glu Ile Trp Thr Leu Leu Asp Lys Val Arg Asp Ile Ala 210 215 220	672
gct gta tcg ggt gcg gaa atc ttg ccg gaa att cat gaa cac tat act Ala Val Ser Gly Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile His Glu His Tyr Thr 225 230 235 240	720
att caa ttt aaa att gca gac cat ggt tac tat gtt tat gat ttt gcc Ile Gln Phe Lys Ile Ala Asp His Gly Tyr Tyr Val Tyr Asp Phe Ala 245 250 255	768
ctg cct atg gtg acg ctc tac agc cta tat tcg ggc aag gtt gac cgt Leu Pro Met Val Thr Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Lys Val Asp Arg 260 265 270	816
ctt gcc aaa tgg ctg aaa atg agt ccg atg aaa cag ttc acc acc ctt Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu 275 280 285	864
gat aca cat gac ggt att ggt gtg gtt gat gtt aag gat atc ctg act	912

Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr	
290 295 300	
gac gaa gaa att acc tat act tct aat gag ctt tat aag gtc ggt gcc	960
Asp Glu Glu Ile Thr Tyr Thr Ser Asn Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala	
305 310 315 320	
aat gtc aat cgt aag tat tca act gcc gaa tat aat aac ttg gat atc	1008
Asn Val Asn Arg Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile	
325 330 335	
tat caa att aat tca act tac tat tca gca ctt ggt gat gat gat caa	1056
Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Gln	
340 345 350	
aaa tac ttt ttg gcc cgc ttg ata caa gct ttt gct cca ggt att cca	1104
Lys Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro	
355 360 365	
cag gtt tat tac gtt ggc ttt tta gct ggc aag aat gat ctt gaa tta	1152
Gln Val Tyr Tyr Val Gly Phe Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Glu Leu	
370 375 380	
ctg gaa agc act aaa gaa ggc cgc aat atc aac cgt cat tat tat agt	1200
Leu Glu Ser Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser	
385 390 395 400	
agt gaa gaa att gct aag gaa gtg aag cgg cca gtt gtc aag gca ctt	1248
Ser Glu Glu Ile Ala Lys Glu Val Lys Arg Pro Val Val Lys Ala Leu	
405 410 415	
tta aat ctc ttt act tac cgc aat cag tca gca gct ttt gat ttg gat	1296
Leu Asn Leu Phe Thr Tyr Arg Asn Gln Ser Ala Ala Phe Asp Leu Asp	
420 425 430	
ggc cgt att gaa gtg gaa acg cca aat gaa gcg acc att gtc ata gaa	1344
Gly Arg Ile Glu Val Glu Thr Pro Asn Glu Ala Thr Ile Val Ile Glu	
435 440 445	
cgt caa aat aaa gat ggc agt cat atc gca aca gca gag att aat ctc	1392
Arg Gln Asn Lys Asp Gly Ser His Ile Ala Thr Ala Glu Ile Asn Leu	
450 455 460	
caa gat atg aca tac aga gta aca gaa aat gat caa aca ata agc ttt	1440
Gln Asp Met Thr Tyr Arg Val Thr Glu Asn Asp Gln Thr Ile Ser Phe	
465 470 475 480	
gaa	1443
Glu	

<210> 22
<211> 481
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A mutant of Streptococcus mutans sucrose phyophorylase

<400> 22

Met Pro Ile Thr Asn Lys Thr Met Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Leu
1 5 10 15

Gly Lys Asn Leu Lys Glu Leu Asn Glu Asn Ile Glu Asn Tyr Phe Gly
20 25 30

Asp Ala Val Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Ser Gly
35 40 45

Asp Arg Gly Phe Ala Pro Ile Asp Tyr His Glu Val Asp Pro Ala Phe
50 55 60

Gly Asp Trp Asp Asp Val Lys Arg Leu Gly Glu Lys His Tyr Leu Met
65 70 75 80

Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Gln Ser Lys Tyr Tyr Lys
85 90 95

Asp Tyr Gln Glu Lys His Glu Ala Ser Ala Tyr Lys Asp Leu Phe Leu
100 105 110

Asn Trp Asp Lys Phe Trp Pro Lys Asn Arg Pro Thr Gln Glu Asp Leu
115 120 125

Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Arg Ala Pro Met Gln Glu Ile Arg
130 135 140

Phe Ala Asp Gly Ser Val Glu His Leu Trp Ser Thr Phe Gly Glu Glu
145 150 155 160

Gln Ile Asp Leu Asp Val Thr Lys Glu Val Thr Met Asp Phe Ile Arg
165 170 175

Ser Thr Ile Glu Asn Leu Ala Ala Asn Gly Cys Asp Leu Ile Arg Leu
180 185 190

Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Leu Asp Thr Asn Asp Phe Phe
195 200 205

Val Glu Pro Glu Ile Trp Thr Leu Leu Asp Lys Val Arg Asp Ile Ala
210 215 220

Ala Val Ser Gly Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile His Glu His Tyr Thr
225 230 235 240

Ile Gln Phe Lys Ile Ala Asp His Gly Tyr Tyr Val Tyr Asp Phe Ala
245 250 255

Leu Pro Met Val Thr Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Lys Val Asp Arg
260 265 270

Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu
275 280 285

Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr
290 295 300

Asp Glu Glu Ile Thr Tyr Thr Ser Asn Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala
305 310 315 320

Asn Val Asn Arg Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile
325 330 335

Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Gln
340 345 350

Lys Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Tyr Val Gly Phe Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Glu Leu
370 375 380

Leu Glu Ser Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser
385 390 395 400

Ser Glu Glu Ile Ala Lys Glu Val Lys Arg Pro Val Val Lys Ala Leu
405 410 415

Leu Asn Leu Phe Thr Tyr Arg Asn Gln Ser Ala Ala Phe Asp Leu Asp
420 425 430

Gly Arg Ile Glu Val Glu Thr Pro Asn Glu Ala Thr Ile Val Ile Glu
435 440 445

Arg Gln Asn Lys Asp Gly Ser His Ile Ala Thr Ala Glu Ile Asn Leu
450 455 460

Gln Asp Met Thr Tyr Arg Val Thr Glu Asn Asp Gln Thr Ile Ser Phe
465 470 475 480

Glu

<210> 23
<211> 1461
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A mutant of Streptococcus mutans sucrose phyophorylase

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1461)

<400> 23

出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 9 1 4 8

195	200	205	
gtt gaa cct gaa atc tgg act ctg cta gat aaa gtt cgt gat ata gct			672
Val Glu Pro Glu Ile Trp Thr Leu Leu Asp Lys Val Arg Asp Ile Ala			
210	215	220	
gct gta tcg ggt gcg gaa atc ttg ccg gaa att cat gaa cac tat act			720
Ala Val Ser Gly Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile His Glu His Tyr Thr			
225	230	235	240
att caa ttt aaa att gca gac cat gat tac tat gtt tat gat ttt gcc			768
Ile Gln Phe Lys Ile Ala Asp His Asp Tyr Tyr Val Tyr Asp Phe Ala			
245	250	255	
ctg cct atg gtg acg ctc tac agc cta tat tcg ggc aag gtt gac cgt			816
Leu Pro Met Val Thr Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Lys Val Asp Arg			
260	265	270	
ctt gcc aaa tgg ctg aaa atg agt ccg atg aaa cag ttc acc acc ctt			864
Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu			
275	280	285	
gat aca cat gac ggt att ggt gtg gtt gat gtt aag gat atc ctg act			912
Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr			
290	295	300	
gac gaa gaa att acc tat act tct aat gag ctt tat aag gtc ggt gcc			960
Asp Glu Glu Ile Thr Tyr Thr Ser Asn Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala			
305	310	315	320
aat gtc aat cgt aag tat tca act gcc gaa tat aat aac ttg gat atc			1008
Asn Val Asn Arg Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile			
325	330	335	
tat caa att aat tca act tac tat tca gca ctt ggt gat gat gat caa			1056
Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Gln			
340	345	350	
aaa tac ttt ttg gcc cgc ttg ata caa gct ttt gct cca ggt att cca			1104
Lys Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro			
355	360	365	
cag gtt tat tac gtt ggc ttt tta gct ggc aag aat gat ctt gaa tta			1152
Gln Val Tyr Tyr Val Gly Phe Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Glu Leu			
370	375	380	
ctg gaa agc act aaa gaa ggc cgc aat atc aac cgt cat tat tat agt			1200
Leu Glu Ser Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser			
385	390	395	400

agt gaa gaa att gct aag gaa gtg aag cgg cca gtt gtc aag gca ctt 1248
 Ser Glu Glu Ile Ala Lys Glu Val Lys Arg Pro Val Val Lys Ala Leu
 405 410 415

tta aat ctc ttt act tac cgc aat cag tca gca gct ttt gat ttg gat 1296
 Leu Asn Leu Phe Thr Tyr Arg Asn Gln Ser Ala Ala Phe Asp Leu Asp
 420 425 430

ggc cgt att gaa gtg gaa acg cca aat gaa gcg acc att gtc ata gaa 1344
 Gly Arg Ile Glu Val Glu Thr Pro Asn Glu Ala Thr Ile Val Ile Glu
 435 440 445

cgt caa aat aaa gat ggc agt cat atc gca aca gca gag att aat ctc 1392
 Arg Gln Asn Lys Asp Gly Ser His Ile Ala Thr Ala Glu Ile Asn Leu
 450 455 460

caa gat atg aca tac aga gta aca gaa aat gat caa aca ata agc tta 1440
 Gln Asp Met Thr Tyr Arg Val Thr Glu Asn Asp Gln Thr Ile Ser Leu
 465 470 475 480

tcc atg ata agc tgt caa aca 1461
 Ser Met Ile Ser Cys Gln Thr
 485

<210> 24
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A mutant of Streptococcus mutans sucrose phyophorylase

<400> 24

Met Pro Ile Thr Asn Lys Thr Met Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Lys Asn Leu Lys Glu Leu Asn Glu Asn Ile Glu Asn Tyr Phe Gly
 20 25 30

Asp Ala Val Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Thr Gly
 35 40 45

Asp Arg Gly Phe Ala Pro Ile Asp Tyr His Glu Val Asp Ser Ala Phe
 50 55 60

Gly Asp Trp Asp Asp Val Lys Arg Leu Gly Glu Lys Tyr Tyr Leu Met
65 70 75 80

Phe Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Gln Ser Lys Tyr Tyr Lys
85 90 95

Asp Tyr Gln Glu Lys His Glu Ala Ser Ala Tyr Lys Asp Leu Phe Leu
100 105 110

Asn Trp Asp Lys Phe Trp Pro Lys Asn Arg Pro Thr Gln Glu Asp Val
115 120 125

Asp Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Arg Ala Pro Lys Gln Glu Ile Gln
130 135 140

Phe Ala Asp Gly Ser Val Glu His Leu Trp Asn Thr Phe Gly Glu Glu
145 150 155 160

Gln Ile Asp Leu Asp Val Thr Lys Glu Val Thr Met Asp Phe Ile Arg
165 170 175

Ser Thr Ile Glu Asn Leu Ala Ala Asn Gly Cys Asp Leu Ile Arg Leu
180 185 190

Asp Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Leu Asp Thr Asn Asp Phe Phe
195 200 205

Val Glu Pro Glu Ile Trp Thr Leu Leu Asp Lys Val Arg Asp Ile Ala
210 215 220

Ala Val Ser Gly Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile His Glu His Tyr Thr
225 230 235 240

Ile Gln Phe Lys Ile Ala Asp His Asp Tyr Tyr Val Tyr Asp Phe Ala
245 250 255

Leu Pro Met Val Thr Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Lys Val Asp Arg

260

265

270

Leu Ala Lys Trp Leu Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu
275 280 285

Asp Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr
290 295 300

Asp Glu Glu Ile Thr Tyr Thr Ser Asn Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala
305 310 315 320

Asn Val Asn Arg Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile
325 330 335

Tyr Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Gln
340 345 350

Lys Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Tyr Val Gly Phe Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Glu Leu
370 375 380

Leu Glu Ser Thr Lys Glu Gly Arg Asn Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser
385 390 395 400

Ser Glu Glu Ile Ala Lys Glu Val Lys Arg Pro Val Val Lys Ala Leu
405 410 415

Leu Asn Leu Phe Thr Tyr Arg Asn Gln Ser Ala Ala Phe Asp Leu Asp
420 425 430

Gly Arg Ile Glu Val Glu Thr Pro Asn Glu Ala Thr Ile Val Ile Glu
435 440 445

Arg Gln Asn Lys Asp Gly Ser His Ile Ala Thr Ala Glu Ile Asn Leu
450 455 460

Gln Asp Met Thr Tyr Arg Val Thr Glu Asn Asp Gln Thr Ile Ser Leu
465 470 475 480

Ser Met Ile Ser Cys Gln Thr
 485

【書類名】図面

【図 1 A】

```

StMSP -----MPIINKTM
StPSP -----MPIQNKT
StSSP -----MTLTNKT
LeuSP -----MEIQNKAM
OenSP -----MPVKNKAM
BifSP -----MKNKVQ
AgrSP -----MKNSVQ
PseuSP -----MKNQVQ
EcoSP ---MKQKITDYLDEIYGGTFTATHLQ-KLV-TRLESAK-R-LITQRRKKHWDE-S-DVV-
ListSP MTNLRKR---LSRLYSEDVVES-LATR-IEARVNQTKQRKLVRKD--K-WDE-K-DIV-

```

```

StMSP LITYADSLGKN---LKELNENI---ENYFGDAVGG-VHLLPFFPST-GDR-GFAPIDYH
StPSP LITYSDSLGNN---LKDLYDNL---EEHFGDAIGG-VHLLPFFPST-VDR-GFAPVDYD
StSSP LITYSDSLGRN---LKELDENI---SIYFGDAIGG-VHLLPFFPST-GDR-GFAPVDYD
LeuSP LITYADSLGKN---LKDVHQVL---KEDIGDAIGG-VHLLPFFPST-GDR-GFAPADYT
OenSP LITYSDSMGKN---IKELQYIL---DKYIGDAIGG-VHLLPFFPST-GDR-GFAPSDYT
BifSP LITYADRLGD---GTLSSMTDI-LRTR---FDGVYDGVHILPFFTPFDGADAGFDPIDHT
AgrSP LITYVDRLSGG---G-FPELRALL-D-GR-LQGLFGGVHALPFFNPIDGADAGFDPIDHT
PseuSP LITYVDRLGGQRDGDARLKLKLLCEPGQPLADVFGGVHLLPFFHAIDGADAGFDPIDHT
EcoSP LITYADQFHNSDLKPLPTFNQFYHQWL-QS-IFSHV-HLLPFYPWSSDD-GFSVIDYH
ListSP LITYGDQFKEESKKTLPFTFKMYDRYL-KS-TFEVV-HFLPFYPYSSDD-GFSVIDYH

```

```

StMSP EVDSAFGDWDDVKCLGEKYYLMFDFMINHISRQSKYYKDYQEKHEASAYKDLFLNWDKFW
StPSP EVDSAFGDWEDVKRLGEKYYLMFDFMINHISRQSKYYKDYQEKHEASEFKALFLNWDKFW
StSSP KVDPAFGDWDDVKRLGAKYYLMFDFMINHISRQSKYYKDYQEKKDASDYADFLRWEKFW
LeuSP RVDAAFGDWADVEALGEEYYLMFDFMINHISRESVMYQDFKKNHDDSKYKDFIRWEKFW
OenSP RVNPDFGDWEDVEELGKYYLMFDFMINHISRESIMYQDFKEKKDASSYKDFIRWEKFW
BifSP KVDERLGSWDDVAELSKTHNIMVDAIVNHMSWESKQFQDVLEKGESEYYPMLTMSVVF
AgrSP IVDPRLGSWDDVRALAGSVEIMADLIVNHVSAQSSWFQDFIAKGSDESFADMFTFGKAF
PseuSP LVDPRLGWSDIKALTEGLEVMGDVIVNHMSSESQFQDFSAKGRESAYDGLFLTLDAVF
EcoSP QVASEAGEWQDIQQLGECSHLMFDFVCNHMSAKSEWFKNYLQQHPG--FEDFFIADVPQT
ListSP AVNPELGWEDIKEMEQSARLMFDFVCNHMSAKSEWFKRYLAGDKE--FQNFVEMDPDT

```

```

StMSP P---KNRPTQED-VDLIYKRKDRAPKQEIQFADGSVE--HL-WNTFGEEQIDLDVTKEVT
StPSP P---ENRPTQSD-VDLIYKRKDRAPKQEIFEDGSVE--HL-WNTFGEEQIDLDVTKEVT
StSSP P---ENRPTQAD-IDLIYKRKDKAPMQEIVFADGTKE--HL-WNTFGEEQIDLDVTKEVT
LeuSP AKAGENRPTQAD-VDLIYKRKDKAPTQEITFDDGTTE--NL-WNTFGEEQIDIDVNSAIA
OenSP PKG---RPTKAD-IDLIYKRKDKAPIQGIFADGSQE--HL-WNTFGDEQIDINVKSIVA
BifSP PNGA----TEED-LAGIYRPRPGLPFTHYKFAGKT----RLVWVSFTPQQVIDTDSDEG
AgrSP PRGA----SEQD-LLNIYRPRLGCRFQRPRLQIGSQ---RMLWTTFTPQQIDIDVHSAHG
PseuSP PNGA----TERD-LLTVYRPRP---GPAELCDAEERRARILWTTFTAQIDIAVHHPQG
EcoSP DLSAVTRPRALPLT-----PFQMRDHSTRHL-----WTTFSDDQIDLNYSPEV
ListSP DLSSVTRPRATPVL-----PFQFASGKEYI-----WTTFSEDQIDLNFAFCEV

```


【図 1 B】

StMSP MDFIRSTIENLAANGCDLIRLDAFAYAVKKLDTNDDFFVEPEIWTLLDKVRDIAAVS--GA
 StPSP MEFIRKTIQHLASNGCDLIRLDAFAYAVKKLDTNDDFFVEPDWDLLDKVRDIAAEY--GT
 StSSP MDFIKKNIEHLAVNGCDLIRLDAFAYAVKKLDTNDDFFVEPEIWDLLTKVQTIKAE--GA
 LeuSP KEFIKTTLEDVVKHGANLIRLDAFAYAVKKVDTNDDFFVEPEIWDTLNEVREILTPL--KA
 OenSP QEFFKDTLQSMVKHGADLIRLDAFAYAIKKIDTNDFFIEPEIWDLLESVRKILDPL--HA
 BifSP WEYLMSIFDQMAASHVSYIRLDAVGYGAKASTSCFMT-PKTFKLSRLREEGVKR--GL
 AgrSP ALYLETILDRFAEANVTIRLDAAGYAIKKAGTSCFMI-DETYAFLAKLAEKARDR--GM
 PseuSP RAYLESILQTFAANGIRMVRLDAVGYAIKKAGASCMM-PETFGFIAEFAQAARAL--GI
 EcoSP LLAMVDVLLCYLAKGAEYVRLDAVGFMWKEPGTSCIHLEKTHLIKLL-RSIDI NVAPGT
 ListSP LYKMDVLMFYLEEGA EYVRLDAVGFMWKVPGTSSIHLDTHEIVKLF-RDLVDMAAPGT

StMSP EILPEIHEHYTIQ--F-KIADHDYVY-YDFALPNVTLYSLYS-SKVDRLAKWLKMS--PM
 StPSP ELLPEIHEHYSIQ--F-KIADHDYVY-YDFALPNVTLYTLYS-SRTERLAKWLKMS--PM
 StSSP DILPEIHEHYSIQ--F-KIAEHDFI-YDFALPNVTLYSLYS-GRVQRLADWLAKS--PM
 LeuSP EILPEIHEHYSIP--K-KINDHGIFT-YDFALPNTTLYTLYS-GKTNQLAKWLKMS--PM
 OenSP EILPEIHEHYTIP--A-KINEYGYFT-YDFVLPVILYLYS-GNPKQLAKWLKMS--PK
 BifSP EILIEVHSYKKQ--V-EIASKVDRV-YDFALPPLLHSL-FTGHVEPVAHWTEIR--PN
 AgrSP EVLVEIHSYRDQ--I-EIASKVDRV-YDFALPPLILHSL-FTGDATALARWLEIS--PH
 PseuSP EVLVEIHAYYQRQ--I-EIASQVDWV-YDFALPPLVLHAFEFKTAGA-LKRWIAVR--PT
 EcoSP VIITETNVPHKDNIA YFGAGDDEAHMVYQFSLPPLVLHAYQKQNV EA-LCAWAQNLTLP
 ListSP IITETNVPHVDNISYFGNGEKEAHMVYQFPLPPLVLHAIHHGNAEF-LSNWAKNLELPE

StMSP KQFTTLD---THDGI GVVDVKDI-LTD-----EEITYTSNELYKVGANVNRKYSTA
 StPSP KQFTTLD---THDGI GVVDVKDI-LTD-----EEDYASNELYKVGANVNRKYSSA
 StSSP KQFTTLD---THDGI GVVDVKDI-LTD-----EEIAYTSDQLYKVGANVNRKYSTA
 LeuSP KQFTTLD---THDGI GVVDARDI-LTD-----DEIDYASEQLYKVGANVKKTYSSA
 OenSP KQFTTLD---THDGI GVVDARDI-LTD-----EEDYTSSELYKVGANVNRKYSSA
 BifSP NAVTVLD---THDGI GVIDIGSDQLDRSLK-GLVPDEDVDNLVNTIHANTHGESQAATGA
 AgrSP NAITVLD---THDGI GVIDVGASDGR---PGLLEPQAIHDLVEEIHRRSEGGSRATGA
 PseuSP NALTVD---THDGI GIDIGADSDRAAHPLVPPEELDALVERIHAASQGQSRKPTGA
 EcoSP SNTTWFNFLASHDGI GLNPLRGLPESEIL-ELVEALQEGALVNWKNPDGTRSPYEIN
 ListSP GKRTFFNFLASHDGI GLNPVRGIPEAEIL-ALVDDLEKEGALVSYKQNPDGTKSPYEIN

StMSP EYNNLDIYQINSTYYSALGDDQ-KYFL-ARLIQAFAPGIPQVYVYVGLAGKNDLELLES
 StPSP EYNNLDIYQINSTYYSALGDDV-KYFL-ARLIQAFAPGIPQIYVYVGLAGKNDLKLEE
 StSSP EYNNLDIYQINSTYYSALGDDK-KYFL-ARLIQAFAPGIPQVYVYVGLAGKNDLKLEK
 LeuSP SYNNDIYQINSTYYSALGNDDA-AYLL-SRVFQVFAPGIPQIYVYVGLAGENDIALLES
 OenSP AYNNDIYQINSTYYSALGNDDK-AYLL-ARAIQIFAPGIPQIYVYVGLAGENDLDLLEK
 BifSP AASNLDLYQVNSTYYSALGCNDQ-HY-LAARAVQFFLPQVYVYVGLAGRNDMELLRR
 AgrSP AASNLDLYQVNCYYDALGRNDD-DY-LIARAIQFFAPGIPQVYVYVGLGGINDMELLGK
 PseuSP AASNLDLYQVNCFFDAMGRNET-AY-LLARAIQFFLPQVYVYVGLAGHNDMELLAR
 EcoSP VTY-MDAL---SRRESSDEERCARFILAHAILLSFP-GVPAIYIQSILGSRNDYAGVEK
 ListSP VTY-MDAL---SKQADTDDLRLSRFLVAHAVLMSIP-GVPAVYVQSILGSRNDYSGVET

【図 1 C】

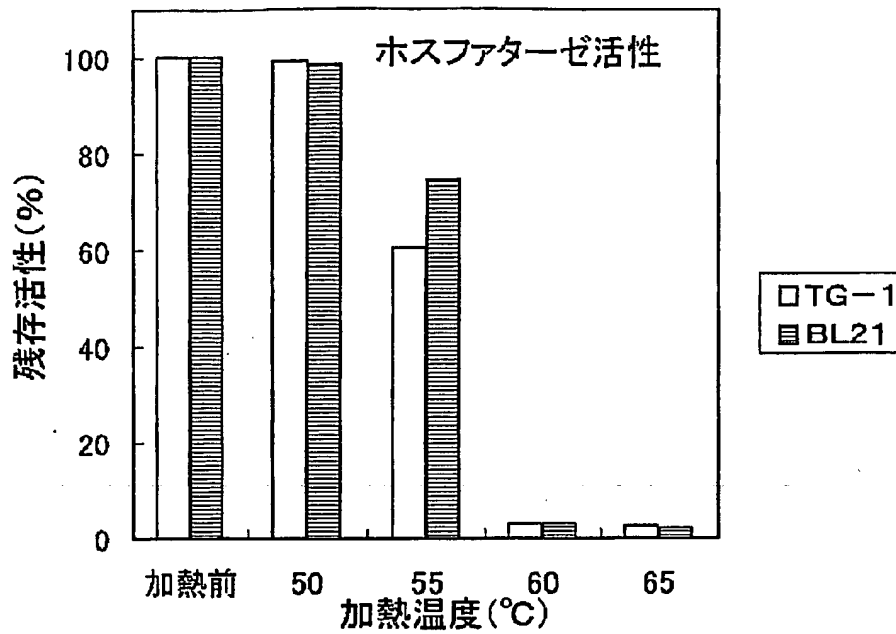
StMSP TKEGRNINRHYYSSSEEIAKEVKRPV-VKA-----LLNLFTYRNQSAAFDLGRIEVEVPN
 StPSP TKEGRNINRHYYSSNEEIAKEVQRPV-VKA-----LLNLFSFRNRSEAFDLEGTTEIETPT
 StSSP TKEGRNINRHYYSSSEEIAHEVERPV-VKA-----LIKLSYRNNSQAFDLGSLTEVLD
 LeuSP TKEGRNINRHYYTREEVKSEVKRPV-VAN-----LLKLLSWRNESPAFDLAGSITVDTP
 OenSP TKEGRNINRHYYSEEEVANEVQRPV-VAC-----LLKLLAWNRNSAAFDLQGDIVQSATD
 BifSP TNNGRDINRHYYSTAEIDENLERPV-VKA-----LNALAKFRNELSAFD--GEFSYEVDG
 AgrSP TGVGGRDINRHFYEDREIDLALLESPL-VKR-----LSDLIRFRNTHPAFN--GSFEVATDD
 PseuSP TQVGGRDINRHYYDAEIASDCERP-VRR-----LIELIRLRNRHPAFG--GVFSVEAGG
 EcoSP LGYNRAINRKKYHSKEITRELNDEATLRHAVYHELRLITLRRSHNEFHDPNNFTID-TI
 ListSP TGHNRSINRKKYDLAEITAEINQADSLRKETYDALTKLISTRKAESLFHPEIPMEVLEST

StMSP EATIVIE-----
 StPSP AHSIVIK-----
 StSSP DHTIVIK-----
 LeuSP DTTIVVT-----
 OenSP KNEIKII-----
 BifSP DTSITFR-----
 AgrSP TGSLVLS-----
 PseuSP DDELHLR-----
 EcoSP NSSVMRIPRSNADGNCLTGLFN-VSKN-IQHVNIT-NLHGRDLISEVDILGNEI-TLRPW
 ListSP -AELFVVKRSSDAES-III-LIHNLSEKEVSYS-LDSGVYTN-LYKGSTVTGSDSIKLRGY

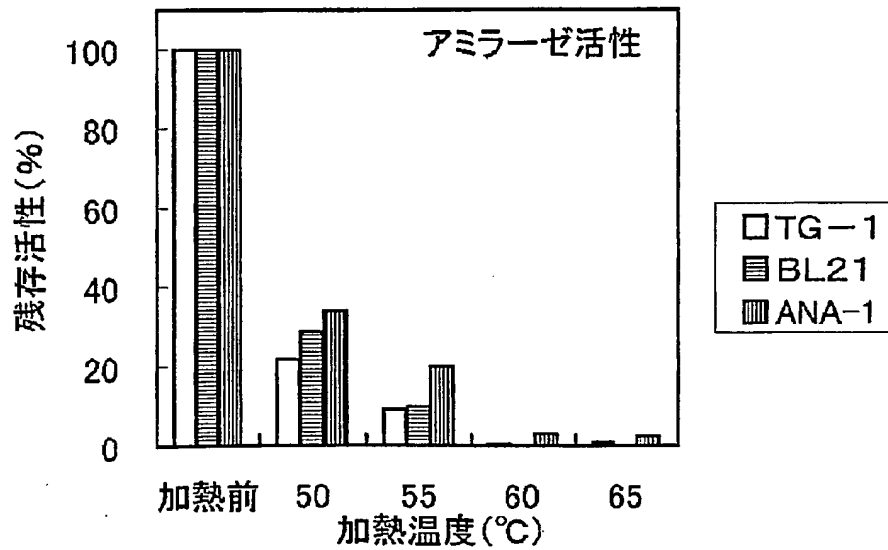
StMSP -----RQNKDGSHIAKAEINLQDMTYRVTENDQTIS-FE-----
 StPSP -----RQNKDKSVTAVVEIDLQNTYRVIENGVEV-----
 StSSP -----RSNQDKSALAQAVINLQDLTYQVTENGQTIT-FE-----
 LeuSP -----RQDENGQNKAVLTADAANKTFEIVENGQTYM-SSD-----NLTON--
 OenSP -----RTSTNGQDTAELTANVALKTFTIKENDKIIIL-IEDQTDTKDI-----
 BifSP -----WTAADGASTAALTFFPG-RGLGTDNATP-VASL-AWSDAAGDHETHD
 AgrSP -----WNLNTEFAQLVVSF-----
 PseuSP -----WQGGGWGPLRVNFASLDHEL-----
 EcoSP QVMWIK-----
 ListSP EFCWLKTKNYREEQK-----

StMSP -----
 StPSP -----
 StSSP -----
 LeuSP -----
 OenSP -----
 BifSP LLANPPIADID-----
 AgrSP -----SQGKATITASGCYDFTFSGAIA
 PseuSP -----SCSRRRRDRFAFS-----
 EcoSP -----
 ListSP -----

【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来のスクロースホスホリラーゼよりも耐熱性が高いスクロースホスホリラーゼを提供すること。

【解決手段】 天然のスクロースホスホリラーゼ (SP) を改変して得られる耐熱化 SP であって、該耐熱化 SP は、特定のアミノ酸配列の T 47 に相当する位置、S 62 に相当する位置、Y 77 に相当する位置、V 128 に相当する位置、K 140 に相当する位置、Q 144 に相当する位置、N 155 に相当する位置および D 249 に相当する位置からなる群より選択される少なくとも 1 つの位置において、該天然の SP とは異なるアミノ酸残基を有し、かつ該耐熱化 SP を 20 mM Tris 緩衝液 (pH 7.0) 中で 55℃ で 20 分間加熱した後の耐熱化 SP の 37℃ における酵素活性が、該加熱前の耐熱化 SP の 37℃ における酵素活性の 20% 以上である。

【選択図】 なし

特願 2003-313305

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000228]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市西淀川区歌島4丁目6番5号

氏 名

江崎グリコ株式会社